ORSAY
Série A
N° d'ordre
1057

Inscrit aux archives originales du
Centre de documentation du
CNRS sous le N° A. O. 7938

THÈSE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Claudine ROUZEAU - AUGÉ

Sujet de la Thèse :

Aspects stéréochimiques dans la biosynthèse du désoxyribose et dans une nouvelle voie de synthèse des désoxyribonucléosides.

SOUTENUE LE 18 DÉCEMBRE 1972, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. S. DAVID — PRÉSIDENT

H. KAGAN
J. LEGAULT-DEMARE — EXAMINATEURS

ORSAY
Série A
N° d'ordre
1057

Inscrit aux archives originales du
Centre de documentation du
CNRS sous le N° A. O. 7938

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Claudine ROUZEAU - AUGÉ

Sujet de la Thèse :

Aspects stéréochimiques dans la biosynthèse du désoxyribose et dans une nouvelle voie de synthèse des désoxyribonucléosides.

SOUTENUE LE 18 DÉCEMBRE 1972, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. S. DAVID — PRÉSIDENT

H. KAGAN
J. LEGAULT-DEMARE — EXAMINATEURS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A V A N T - P R O P O S

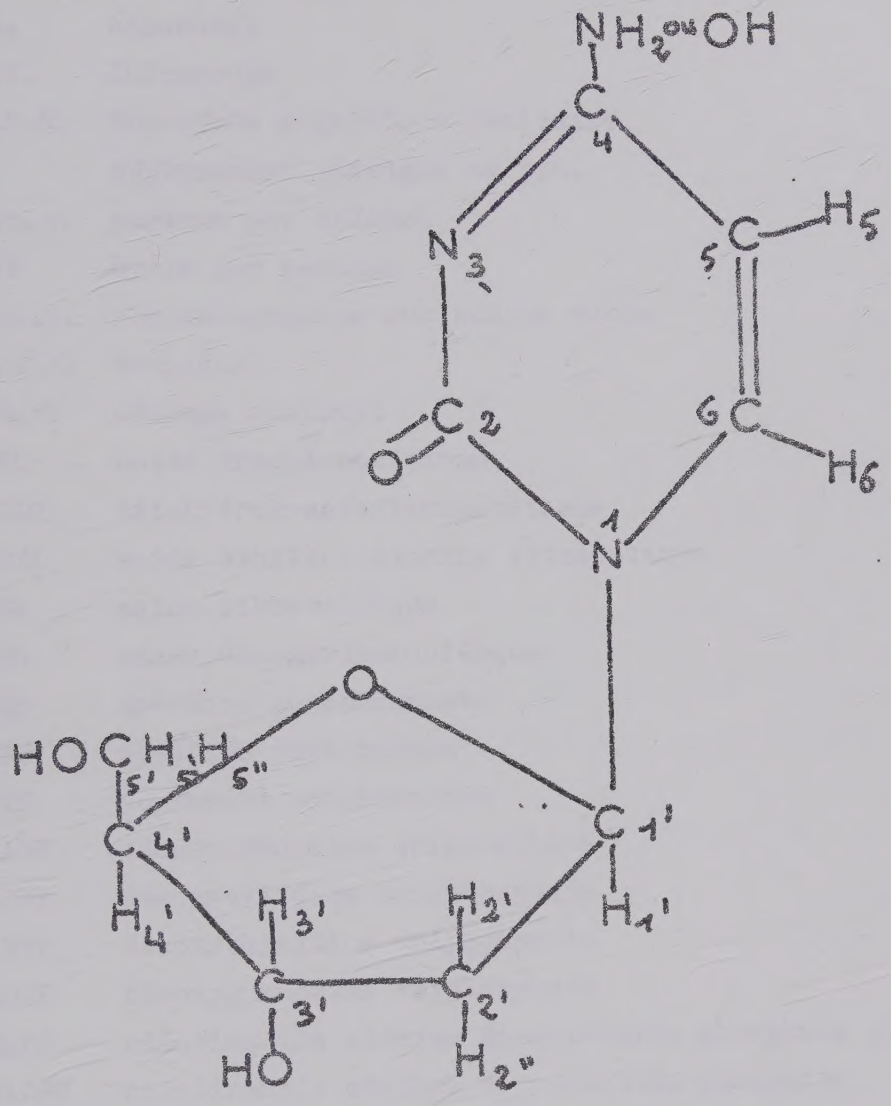
J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur S. DAVID qui m'a proposé le présent sujet et qui m'a guidée tout au long de ce travail.

J'adresse mes remerçiements à Monsieur F. ZAJDELA qui nous a obligeamment fourni le type d'hépatome isolé dans son laboratoire et sur lequel nous avons pu travailler.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur H. KAGAN et Monsieur le Professeur J. LEGAULT-DEMARE d'avoir bien voulu accepter de faire partie du Jury de cette thèse.

Enfin, je suis reconnaissante à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail et spécialement à mes camarades de laboratoire.

Numérotation des nucléosides pyrimidiques



exemple : désoxycytidine
désoxyuridine

PRINCIPALES ABREVIATIONS

F	point de fusion
U.V.	Ultraviolet
nm.	nanomètre
I.R.	Infrarouge
R.M.N.	Résonance magnétique nucléaire
δ	déplacement chimique en ppm.
p.p.m.	parties par million
c/s	cycle par seconde
c.c.m.	chromatographie sur couche mince
trityl	triphényl
mésyl	méthane sulfonyl
TCA	acide trichloracétique
TRIS	trishydroxyméthylaminométhane
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
RNA	acide ribonucléique
DNA	acide désoxyribonucléique
CMP	cytidine monophosphate
CDP	cytidine diphosphate
ATP	adénosine triphosphate
dATP	désoxyadénosine triphosphate
dCMP	désoxycytidine monophosphate
dTTP	désoxythymidine triphosphate
dGTP	désoxyguanosine triphosphate
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme oxydée
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate " réduite

I N T R O D U C T I O N

Le sujet de notre travail concerne un problème de biosynthèse : celle du désoxyribose et des désoxyribonucléotides. Nous l'avons abordé en ayant recours à l'emploi de traceurs isotopiques, et de substrats radioactifs, que nous avons d'ailleurs, pour l'un d'eux, synthétisé nous-même. Nous avons également mis au point une série de méthodes de dégradation permettant de localiser les isotopes sur les produits dérivés après action in vivo ou in vitro de ces composés marqués.

Ces méthodes mises au point ont permis d'apporter une contribution à l'étude d'un mécanisme d'action purement chimique, celui des hydrures organostanniques, en examinant la réduction de bromo-désoxynucléoside par l'hydrure de tri-n-butylétain.

Notre travail présente donc un double aspect. L'exposé des méthodes chimiques constitue la première partie. La deuxième partie concerne les études de biosynthèse proprement dites, chez les bactéries d'une part, dans les tissus animaux d'autre part, et constitue la partie biochimique de ce travail.

Première Partie : METHODES CHIMIQUES

DISCUSSION

I - PREPARATION DE SUBSTRATS RADIOACTIFS : SYNTHESE DE CYTIDINE-5'-MONOPHOSPHATE [2'-^{3}H]

II - DEGRADATIONS CHIMIQUES

A - Localisation du tritium sur le désoxynucléoside [2'-^{3}H]

B - Etude de la réduction de bromo-2' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] par l'hydrure de tri-n-butylétain

C - Hydrolyse de la désoxycytidine

D - Dégradation du ribose

E - Dégradation du désoxyribose

DISCUSSION

I - PREPARATION DE SUBSTRATS RADIOACTIFS : SYNTHESE DE CYTIDINE 5'-MONOPHOSPHATE [2'-^{3}H]

Au cours de nos études biosynthétiques, nous avons eu à utiliser des substrats radioactifs : sucres et nucléotides marqués. Alors que le glucose [6-^{14}C] la cytidine 5'-mono ou diphosphate [2-^{14}C] ou [U-^{14}C] sont des produits commerciaux, nous avons été amenés à préparer comme substrat de l'enzyme, la ribonucléotide réductase, la cytidine 5'-monophosphate [2'-^{3}H], ce qui a été fait par l'intermédiaire de l'uridine [2'-^{3}H] IIa.

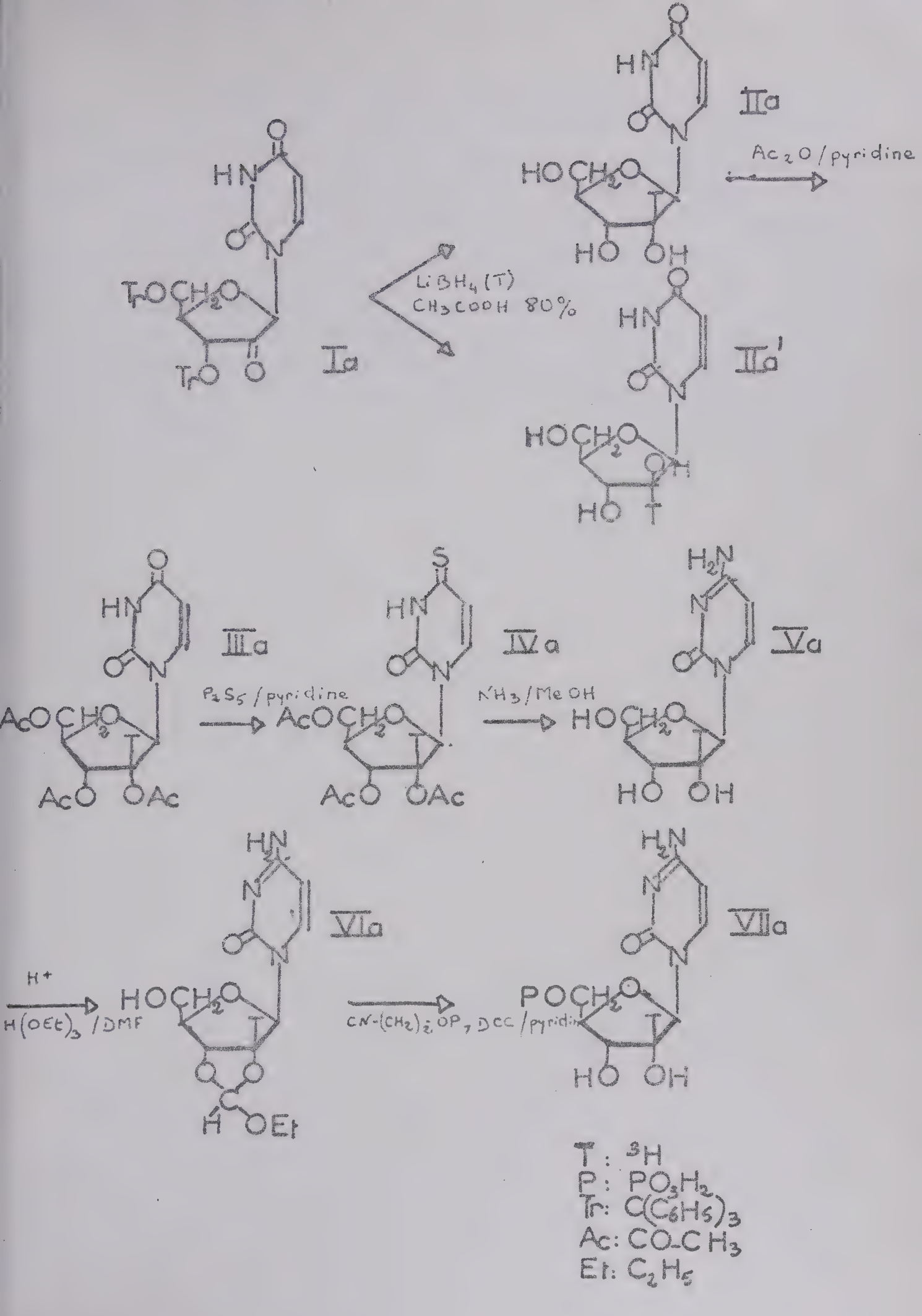
La méthode employée pour obtenir le nucléoside spécifiquement tritié en 2', est la réduction avec le borohydrure de sodium tritié, du dityrityl-O-3',5' céto-2' uridine (Ia). Ce composé est obtenu par oxydation dans le diméthyl sulfoxide avec la dicyclohexylcarbodiimide en présence de trifluoroacétate de pyridinium, du dityrityl-O-3',5' uridine. La réduction de Ia, décrite par MOFFATT (1), avec un gros excès de borohydrure dans l'éthanol, libère, après détritylation, les deux produits de réduction : uridine (IIa) et arabinosyluracile (II'a) dans le rapport 1/4.

Notre travail a consisté à adapter cette réaction à l'emploi de borohydrure tritié. Dans un premier essai, nous sommes partis de 1 mc de borohydrure de sodium tritié d'activité spécifique 600 mc/mmole. Nous avons réalisé la réduction dans la n-butylamine solvant dans lequel était dissous le borohydrure fourni, en prenant une mole de Ia pour une demi-mole de réducteur. Nous avons constaté la formation des deux isomères, IIa et II'a, séparables par chromatographie sur papier dans le système Buthanol ; Ethanol ; H_2O (40 ; 11 ; 19), cette fois dans un rapport 1/7 correspondant à un rendement de 6% en IIa, 43% en II'a par rapport au produit de départ Ia. L'activité spécifique attendue sur ces produits est le quart de celle du borohydrure [^{3}H] de départ : 150 mc/mmole. Or, nous avons trouvé pour l'uridine [2'-^{3}H] IIa 6 à 7 mc/mmole

et pour l'arabinosyluracile [2'-^{3}H] II'a 1 mc/mmole. La forte dilution d'activité enregistrée ne peut s'expliquer que par un effet isotopique, par surcroît différent pour l'un et l'autre isomère. De tels effets isotopiques sont courants et ont déjà été observés avec l'emploi de cet hydrure tritié (2).

Cette constatation nous a conduit à envisager dans un deuxième essai la manipulation au départ d'activité beaucoup plus élevée. Nous avons eu le concours du Service du Professeur FIGHAT du C.E.A. qui s'est chargé de la réduction de Ia : celle-ci a été effectuée en milieu hydro-alcoolique avec 300 mc de borohydrure de lithium [^{3}H] d'activité spécifique soixante fois plus élevée que précédemment et en prenant des quantités équimoléculaires de Ia et de borohydrure. Cette activité spécifique correspond d'ailleurs à un atome sur quatre d'hydrogène tritié par molécule. Après élimination du tritium mobile, le produit brut de réduction nous a été livré en solution aqueuse saturée de benzène : l'activité totale était de 100 mc environ, amenant l'activité spécifique théorique attendue sur l'uridine [2'-^{3}H] IIa à 10 mc/µmole. Un dixième de cette solution a été chromatographié sur papier dans le système ci-dessus pour séparer les deux isomères IIa et II'a.

IIa a été entraîné par 10 mg(40 µmoles) d'uridine inactive ; à partir de là, nous avons synthétisé la cytidine 5'-monophosphate [2'-^{3}H] VIIa. Les méthodes employées ont été les voies de synthèse classique. Les seules difficultés rencontrées relèvent de la miniaturisation de ces réactions. Le passage de l'uridine à la cytidine se fait par l'intermédiaire d'un composé soufré (3) : après acétylation de IIa et traitement de la triacétyl-O-2',3',5' uridine [2'-^{3}H] IIIa par le pentasulfure de phosphore dans la pyridine, nous avons obtenu la triacétyl-O-2',3',5' thio-4 uridine [2'-^{3}H] IVa dont l'ammoniolyse a conduit à la cytidine [2'-^{3}H] Va avec un rendement quantitatif. La phosphorylation de Va a été effectuée sur 5 mg en appliquant la méthode de FROMAGEOT (4) : les hydroxyles en 2' et 3' du composé Va sont bloqués par l'orthoformiate d'éthyle en présence de β cyanoéthylphosphate qui devient ensuite l'agent phosphorylant. Ce procédé a l'avantage de n'isoler aucun intermédiaire. Le rendement en cytidine 5'-monophosphate [2'-^{3}H] VIIa était de 10 µmoles (25% par rapport à IIa).


IIa
Ac2O / pyridine
LiBH4 (T)
CH3COOH 80%
Ia
IIa'
IIIa
P2S5 / pyridine
IVa
NH3 / MeOH
Va
VIa
H+
H(OEt)3 / DMF
CN-(CH2)2OP, DCC / pyridine
VIIa
T : 3H
P : PO3H2
Tr : C(C6H5)3
Ac : CO-CH3
Et : C2H5

VIIa a été en dernier lieu purifié par chromatographie sur colonne Dowex 50 H^+, ce qui a permis d'éliminer une fraction contaminante d'uridine 5'-phosphate et une impureté radioactive dont la zone d'élution juste après le pic cytidine 5'-monophosphate correspond à celle de la désoxycytidine 5'-monophosphate. De plus, nous avons vérifié qu'à ce stade de purification, VIIa donne bien une seule tache en chromatographie sur papier dans le système borate (5), correspondant au nucléoside phosphate porteur de deux hydroxyles adjacents libres, ce qui exclut l'existence d'isomères éventuels 3'-phosphate ou 2'-phosphate. L'activité spécifique de VIIa était en définitive de 22 mc/mmole, c'est-à-dire tout à fait analogue à celle des produits commerciaux que nous utilisons.

II - DEGRADATIONS CHIMIQUES

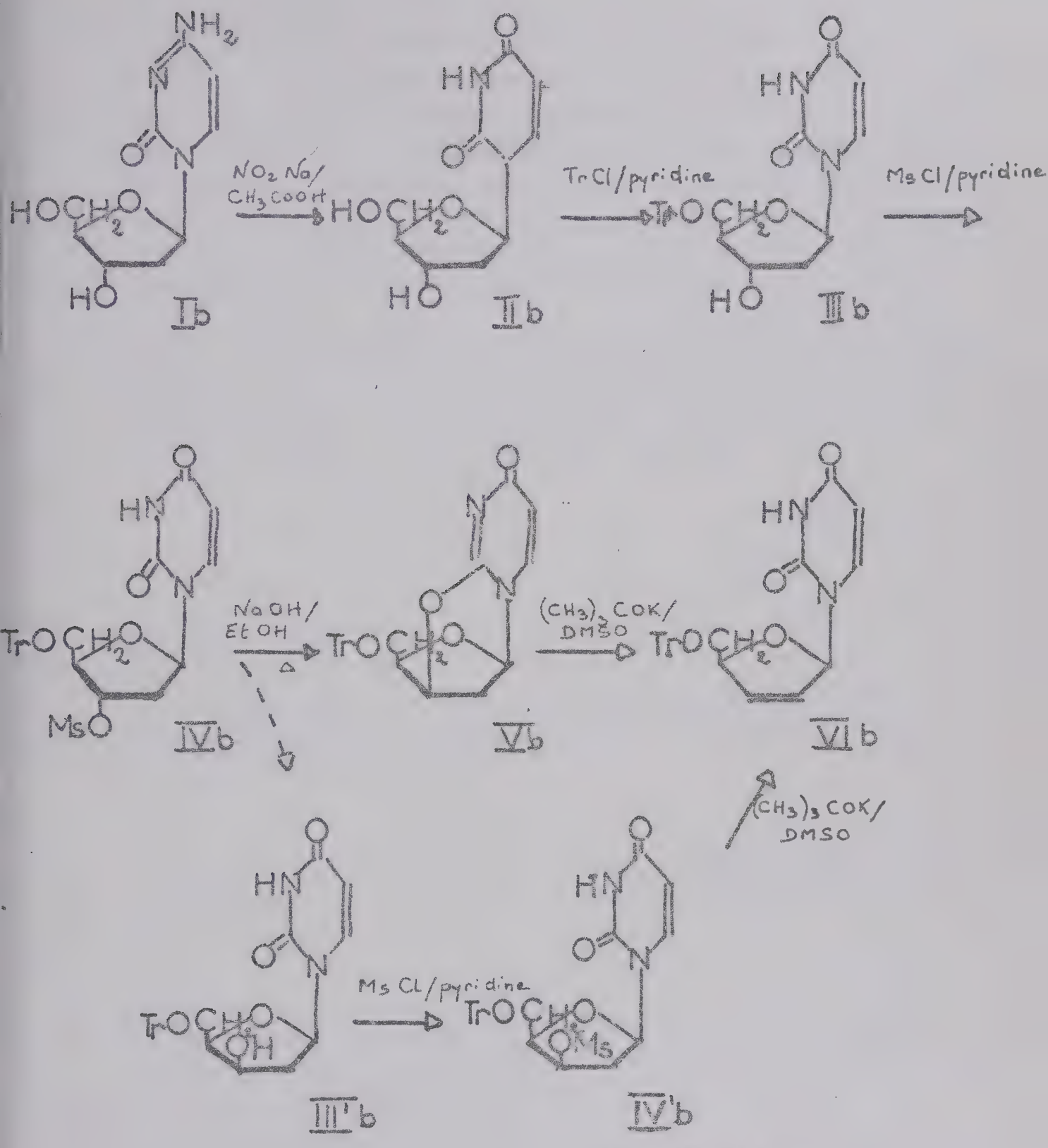
A - LOCALISATION DU TRITIUM SUR LE DESOXYNUCLEOSIDE [2'-^{3}H]

Le problème était de savoir si, sur un échantillon de désoxycytidine biosynthétique, le tritium lié à C-2' était en cis ou trans de la base.

Nous avons appliqué une réaction connue et décrite dans la littérature (6) : la réaction d'anti élimination de l'hydrogène en 2' de la trityl-O-5' anhydro-2,3' désoxy-2' uridine Vb aboutissant au produit insaturé trityl-O-5' dideoxy-2',3' uridinène-2' VIb. VIb dérivant de la désoxycytidine [2'-^{3}H] Ib doit être marqué si l'isotope radioactif est à l'origine en position cis par rapport à la base.

Nous nous sommes attachés à miniaturiser toute la suite des réactions partant de Ib et aboutissant à VIb pour avoir à notre disposition une méthode de dégradation facilement utilisable. Ib est désaminée en désoxyuridine IIb qui est bloquée successivement en 5' par le groupement trityl, en 3' par le groupement mésyl. La trityl-O-5' mésyl-O-3' désoxyuridine IVb traitée par un équivalent de soude dans l'éthanol quarante-cinq minutes à reflux conduit à la trityl-O-5' anhydro-2,3' désoxyuridine Vb qui, attaquée par le terbutylate de potassium dans le diméthylsulfoxide, aboutit à la formation du composé insaturé VIb. En partant de 40 mg de chlorhydrate de Ib, nous avons obtenu 7 mg de VIb (rendement global 10%). Les composés Vb et VIb présentent en outre l'avantage d'être facilement cristallisables, d'où spécialement propices à des mesures radioactives.

La formation du composé anhydro Vb exige un contrôle soigneux de la réaction car une hydrolyse prolongée conduit au composé isomère de IIIb le trityl-O-5' désoxy-2' β D lyxosyluracile III'b. Mais ce composé, que nous avons obtenu prépondérant pour l'un de nos essais, une fois mésylé en 3', puis traité par le terbutylate de potassium dans le diméthylsulfoxide dans les mêmes conditions que Vb, subit également une trans élimination aboutissant au composé VIb : celui-ci a été identifié par son spectre U.V. et son chromatogramme dans les deux systèmes utilisés : chloroforme ; acétate d'éthyle : 1;1- éthanol ; benzène : 1;1.



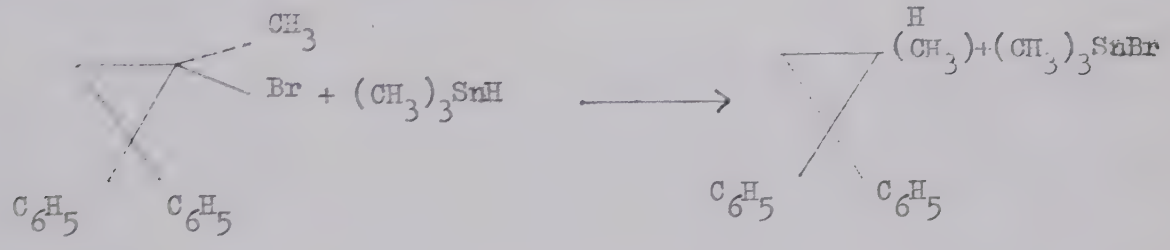
Tr: $C(C_6H_5)_3$

Ms: SO_2CH_3

B - REDUCTION PAR L'HYDRURE DE TRI-n-BUTYLETAIN

La réduction des composés halogénés par les hydrures organostanniques présente de nombreux avantages.: la réduction a lieu avec de bons rendements, dans des conditions souvent douces, très sélectivement : réduction de l'halogène seul dans les composés halogénés insaturés, dans les composés halogénés cétoniques. Ces réactions sont accélérées par la présence de sources de radicaux libres, ce qui, de toute évidence, indique que la réduction met en jeu un mécanisme radicalaire.

Dans de nombreux cas, la réduction ne semble pas être stéréospécifique : ainsi le bromo-1 méthyl-1 diphényl-2,2 cyclopropane, composé optiquement actif, réduit par l'hydrure de triméthylétain, conduit au racémique méthyl-1 diphényl-2,2 cyclopropane (7) :



Cependant, il a été constaté également que la réduction des fluorocyclopropanes halogénés par l'hydrure de tri-n-butylétain a lieu de façon stéréospécifique (8) :

De même, un mélange des deux épimères du chloro-7 phényl-7 norcarane donne par action de l'hydrure de triphénylétain 80% de l'isomère endo et 1% seulement de l'isomère exo (9).

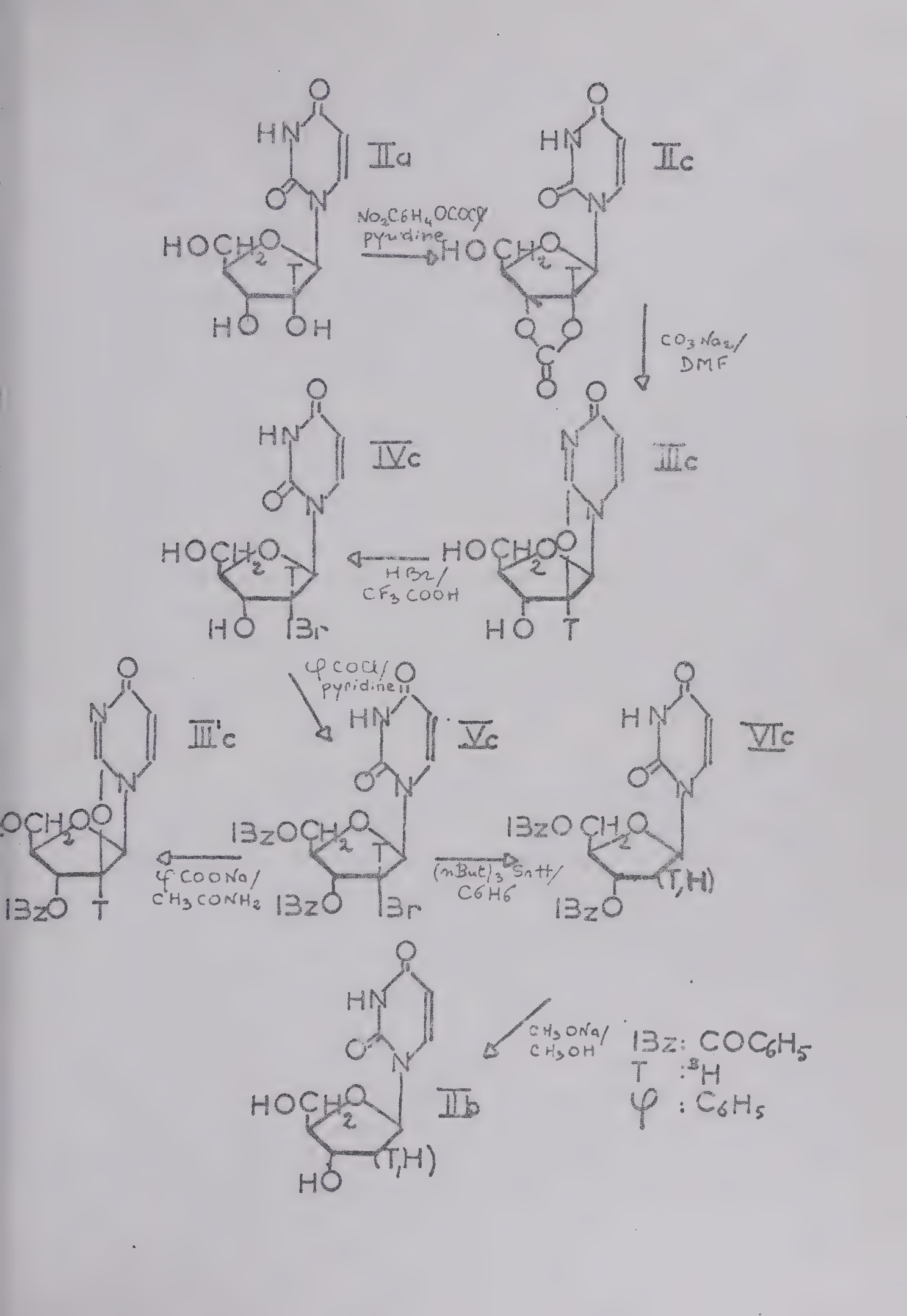
Dans cette perspective, nous avons étudié la stéréochimie de la réduction de la bromo-2' désoxy-2' uridine IVc par l'hydrure de tri-n-butylétain. Dans le cas où la réaction serait stéréospécifique, nous aurions là un moyen d'accès facile au nucléoside deutéré en 2' par simple

action d'hydrures organostanniques deutérés. Ce travail ne posait pas de problèmes nouveaux puisque d'une part, nous disposions d'un stock important d'uridine 2'-tritiée et que, d'autre part, nous avions en main une méthode adaptée de localisation du tritium après réduction.

La voie d'accès aux halogéno-2' désoxy-2' nucléosides est l'ouverture des anhydro-2,2' nucléosides par l'hydracide correspondant en milieu anhydre. De cette façon ont été synthétisées la fluoro-2', la chloro-2', la bromo-2' désoxy-2' uridine. (10). Pour le dérivé iodo, la méthode est différente : c'est la trityl-O-5' tosyl-O-2' uridine qui, traitée par l'iodure de sodium dans l'acétonylacétone, conduit au mélange des deux produits : trityl-O-5' anhydro-2,2' β D arabinofuranosyluracile et trityl-O-5' iodo-2' désoxy-2' uridine (11). De ce fait, bien que les composés iodo soient des halogènés les composés les plus réactifs avec les hydrures organostanniques, nous avons choisi de synthétiser la bromo-2' désoxy-2' uridine.

L'uridine 2'-tritiée, synthétisée de la façon décrite, a été soigneusement purifiée par chromatographie sur papier dans deux systèmes de solvants différents, dont le système borate de REICHARD (5) qui a l'avantage de séparer nettement uridine complexée, et arabinosyluracile, non complexé par les ions borates, puis diluée par une grande quantité d'uridine entraîneur (12 mmoles pour 0,7 µc) amenant l'activité spécifique théorique sur IIa à 130.000 dpm/mmole.

Il existe plusieurs méthodes pour accéder à l'anhydro-2,2' uridine IIIc. La méthode classique passant par la trityl-O-5' tosyl-O-2' uridine (10) est longue et le rendement global mauvais (9%). Une des plus récentes, nécessitant le moins d'intermédiaires, pour laquelle nous avons opté, est celle de OGILVIE : par action du paranitrophénylchloroformiate sur l'uridine en quantités équimoléculaires dans la pyridine cinq jours à température ambiante, il obtient le carbonate-2',3' uridine IIc avec un rendement de 70% (12). IIc en milieu faiblement basique, c'est-à-dire traité par le carbonate de sodium dans la diméthylformamide, conduit à l'anhydro-2,2' uridine IIIc avec un rendement de 72% (13). Cependant, nous n'avons pas obtenu ces rendements publiés : pour la première étape, nous n'avons pu, une fois la réaction terminée, dissoudre totalement le produit qui était à reprendre dans l'acétone. Cette fraction insoluble n'a pas été identifiée : en I.R., outre les bandes à


IIa
IIc
$NO_2C_6H_4OCOCl$
pyridine
CO_3Na_2/
DMF
IVc
IIIc
HBr/
CF_3COOH
III'c
$\varphi COCl$/
pyridine
Vc
VIc
$\varphi COONa$/
CH_3CONH_2
$(nBut)_3SnH$/
C_6H_6
IIb
CH_3ONa/
CH_3OH
Bz: COC_6H_5
T : ^3H
φ : C_6H_5

1800 cm^{-1} (CO carbonate) et à 1685 cm^{-1} (CO uridine), on en observe une supplémentaire à 1750 cm^{-1} correspondant à une fonction ester. Nous sommes parvenus à en dissoudre un aliquot dans l'acide acétique qui, en chromatographie sur papier, a donné une tache correspondant à IIc. Ce produit pourrait être un dimère, formé de deux molécules d'uridine liées par un CO intermoléculaire. Dans la formation de l'anhydro IIIc à partir du carbonate cyclique IIc, il semble que nous ayons obtenu également en quantité importante le produit d'ouverture l'arabinosyluracile II'a. Le rendement final en IIIc était de 15% par rapport à l'uridine IIa. IIIc a été caractérisé par son spectre U.V. et par identification avec un échantillon préparé selon la voie classique.

L'anhydro-2,2' uridine [2'-^{3}H] IIIc est converti en bromo-2' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] IVc selon CODINGTON (10) : IVc est obtenu avec un rendement de 75% par action de l'acide bromohydrique sur IIIc dissous dans l'acide trifluoroacétique en milieu rigoureusement anhydre. En effet, des traces d'eau hydrolysent IIIc en arabinosyluracile II'a, cette réaction étant beaucoup plus rapide que l'attaque nucléophile sur le C-2'. Par contre, le composé halogéné résultant, en l'occurence le bromo, prend la configuration ribo. Il a été montré que la voie de synthèse mettant en jeu l'intermédiaire éventuel 2',3' époxy était exclue et, par conséquent, exclue aussi la formation d'isomères 3'-bromo configuration xylo, 2'-bromo configuration arabino (14).

IVc est ensuite bloqué sur les fonctions alcool 5' et 3' susceptibles de réagir avec le bromure de tri-n-butylétain formé au cours de la réduction, par des groupements benzoates, les fonctions esters étant réduites par les hydrures organostanniques dans des conditions beaucoup plus vigoureuses que les fonctions halogénées. IVc traité par deux équivalents de chlorure de benzoyle dans la pyridine conduit au dibenzoyl-O-3',5' bromo-2' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] Vc avec un rendement de 60%. Après purification sur colonne de gel de silice, le produit a cristallisé dans l'alcool (F : 167-169°). Son spectre U.V. présente les caractéristiques d'un dibenzoate. Nous avons de plus à ce stade obtenu la confirmation de la configuration ribo : en traitant Vc par le benzoate de sodium dans l'acétamide fondu, nous avons obtenu, comme il est décrit pour les dérivés mésylés (14), un produit unique identifié au dibenzoyl-O-3',5' anhydro-2,3' uridine III'c par comparaison des point de fusion et spectre U.V. avec ceux publiés dans la littérature (15).

La réduction proprement dite est réalisée dans le benzène, en présence d'$\alpha\alpha'$ azobisisobutyronitrile, source de radicaux libres, trente minutes à reflux avec deux équivalents d'hydrure selon HOLY (16) et FARKAS (17). Nous avons obtenu un seul produit de réduction identique en c.c.m. au produit obtenu directement de la benzoylation de la désoxy-2' uridine, avec un rendement variant de 33% à 45%. Nous avons donc récupéré également 55% à 67% du produit de départ Vc. Une prolongation du temps de réaction n'améliore pas le rendement. Par contre, on aurait eu vraisemblablement de meilleurs résultats avec un excès de trois à quatre fois en hydrure par rapport à Vc.

VIc n'est pas recristallisé, mais directement débenzoylé, quantitativement, en traitant par le méthylate de sodium dans le méthanol. Sur la désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] IIb ainsi obtenue, nous avons appliqué la dégradation mise au point et décrite ci-dessus (cf § II-A) pour localiser le tritium et déterminer la stéréospécificité de la réduction.

L'activité spécifique des différents produits IIIc, IVc, Vc cristallisés a été contrôlée au fur et à mesure de la synthèse. Après action de l'hydrure de tri-n-butylétain, nous avons vérifié que l'activité était toujours présente sur le produit réduit VIc. Dans ce cas, la mesure a été faite sur le produit non recristallisé et contaminé avec de la silice, ce qui explique que l'on ait observé une baisse d'activité de 30% environ.

Dans la suite, au cours de la dégradation de IIb, l'activité spécifique de l'anhydro cristallisé (Vb) a été encore une fois mesurée : elle était toujours rigoureusement constante par rapport à celle des produits précurseurs IIIc, IVc, Vc. Enfin, après action du terbutylate de potassium sur Vb, nous avons trouvé sur le produit insaturé (VIb) cristallisé également, 80% de l'activité spécifique antérieure. Une autre mesure faite sur un aliquot de VIb purifié sur plaque de gel de silice et dosé en U.V. avant d'être passé au scintillateur a confirmé ce résultat.

Nous pouvons donc conclure que la réduction du dibenzoyl-O-3',5' bromo-2' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] Vc par l'hydrure de tri-n-butylétain s'est faite à 80% avec rétention de la configuration du carbone C-2'. Il aurait été satisfaisant de retrouver l'activité complémentaire qui a été éliminée après action du terbutylate sur l'eau. Mais ceci n'a pu être mis en évidence du fait probablement que nous tombions dans des zones d'activité trop faibles et trop diluées.

TABLEAU RECAPITULATIF DES MESURES RADIOACTIVES

	dpm mesurées	quantité de produit ayant servi à la mesure en mg	dpm/mg	activité spécifique dpm/µ mole
Uridine [2'-^{3}H] IIa				130
Anhydro-2,2' uridine [2'-^{3}H] IIIc				
F : 240-244°	710	2,293	309	70
	252	0,866	290	65,5
F : 234-241°	985	3,091	318	72
	400	1,270	315	71
Bromo-2' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] IVc	494	2,223	222	68
Dibenzoyl-O-3',5' bromo-2' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] Vc	465	3,424	135	70
Dibenzoyl-O-3',5' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] (1) VIc	286	2,360	121	53
	240	2,082	115	50

	quantité totale de produit en µ mole	dpm mesurées	quantité de produit ayant servi à la mesure en mg	µmole	dpm/mg	activité spécifique dpm/µ mole
Trityl-O-5' anhydro-2,3' [2'-^{3}H] Vb F : 120-135°	20	345	2,108		163	74
Trityl-O-5' didéoxy-2',3' uridinène-2' [2'-^{3}H] VIb F : 190-192°	7	135(2)		2,6		52
		224	1,82		123	55

Toutes les mesures ont été faites sur des produits cristallisés, sauf :

(1) produit élué d'une plaque de gel de silice contenant 30% de silice d'après dosage U.V.

(2) produit élué également d'une plaque de gel de silice mais dont le quantité passée au scintillateur a été déterminée très précisément par dosage U.V.

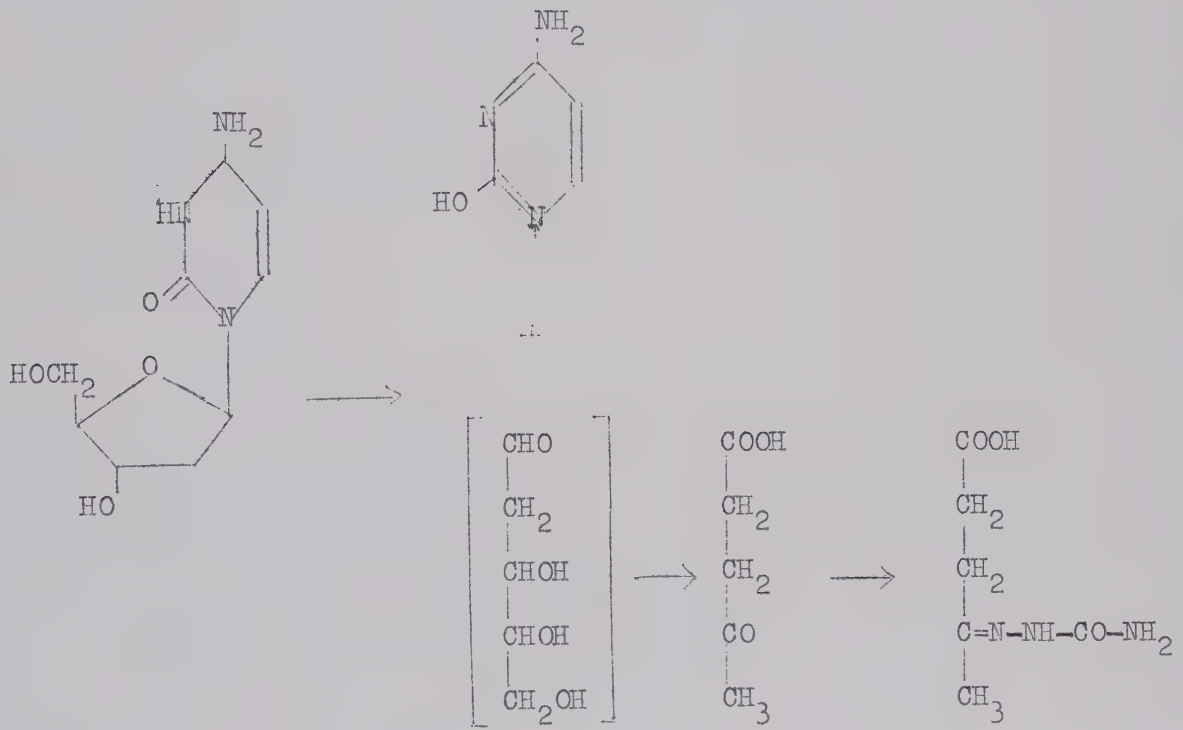
La prépondérance de rétention de configuration du carbone C-2' peut s'expliquer en faisant intervenir le noyau pyrimidique qui participerait à la stabilisation du radical libre en 2' et, de ce fait, serait un empêchement stérique à l'attaque du carbone C-2' par l'hydrure de ce côté-là de la molécule.

C - HYDROLYSE DE LA DESOXYCYTIDINE

En rapport avec notre travail biochimique, nous avons eu à mettre au point une méthode permettant d'isoler la partie sucre de la désoxycytidine [U-^{14}C] de façon à en déterminer l'activité spécifique par rapport à celle de la molécule entière.

La désoxycytidine est hydrolysée par l'acide sulfurique normal pendant huit heures à 100°. Dans ces conditions, le désoxyribose libéré est converti en acide lévulique. L'acide lévulique est recueilli par extraction continue à l'éther et isolé sous forme de sel de sodium.

Le lévulate est caractérisé par sa semicarbazone facilement recristallisable dans l'eau (F : 195°), obtenue en faisant agir sur le lévulate de sodium une quantité stoechiométrique de chlorhydrate de semicarbazide.



D - DEGRADATION DU RIBOSE

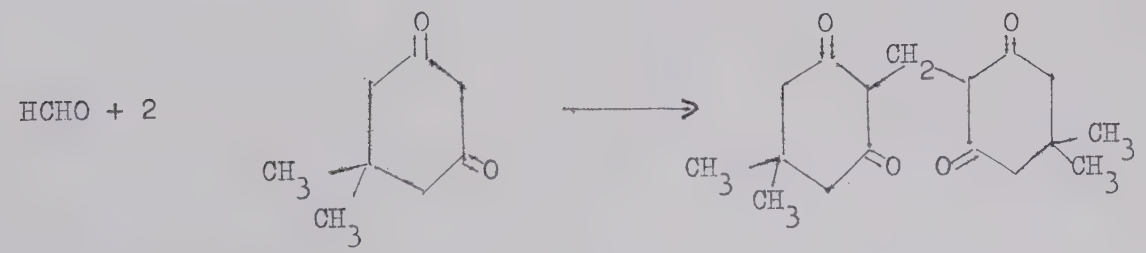
Le ribose est dégradé selon des méthodes simples, pour libérer les carbones C-1 et C-5 sous forme cristallisable et donc propice à des mesures radioactives.

L'oxydation périodique du ribose selon REEVES (18) libère quatre molécules d'acide formique et une molécule d'aldéhyde formique qui dérive de la fonction alcool primaire (C-5). Ce formaldéhyde est condensé sur le dimédon : le dérivé formaldéhyde dimédon précipite immédiatement (F : 187-188°).

D'autre part, le ribose est réduit en ribitol, facilement cristallisable dans l'alcool (F : 97-98°), par le borohydrure de sodium et l'oxydation périodique du ribitol fournit, de la même façon que celle du ribose, deux molécules de formaldéhyde résultant des deux fonctions alcool primaire (C-1 + C-5) qui sont également précipitées par le dimédon.

$$CHO - CHOH - CHOH - CHOH - CH_2OH \longrightarrow 4\ HCOOH + HCHO$$

$$CHO - CHOH - CHOH - CHOH - CH_2OH \longrightarrow CH_2OH - CHOH - CHOH - CHOH - CH_2OH \longrightarrow 3\ HCOOH + 2\ HCHO$$



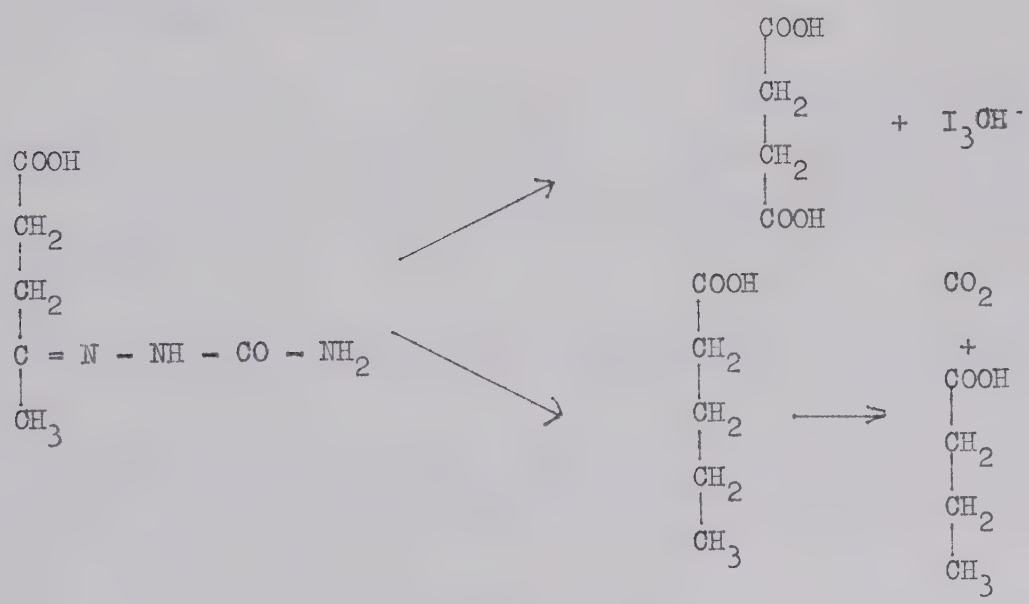
E - DEGRADATION DU DESOXYRIBOSE

Comme pour le ribose, nous recherchions une méthode de dégradation permettant d'accéder facilement aux carbones C-1 et C-5 sous forme cristallisable.

Le désoxyribose obtenu de l'hydrolyse acide du DNA est immédiatement transformé en acide lévulique isolé de la façon décrite ci-dessus (cf § II-C) sous forme de semicarbazone.

Le carbone C-5 est libéré par la réaction à l'iodoforme. (19). La semicarbazone est dissoute à chaud en milieu basique et traitée par une solution d'iode dans l'iodure de potassium. La rupture de la liaison $C_4 - C_5$ libère C-5 sous forme d'iodoforme (F : 124°).

Pour isoler le carbone C-1, l'acide lévulique est d'abord réduit en acide valérique par le procédé Wolff-Kishner modifié en traitant directement la semicarbazone par le réactif réducteur, mélange d'hydrazine et de potasse dans le glycol, en tube scellé pendant quatre heures à 48°. L'acide valérique subit une dégradation de Schmidt qui libère le carbone C-1 sous forme de gaz carbonique piégé par la baryte.



PARTIE EXPERIMENTALE

DETAILS EXPERIMENTAUX GENERAUX

- Les mesures de radioactivité ont été faites :

. pour le [^{14}C], avec un compteur Frieseke-Hoepfner sans fenêtre, à circulation de méthane, par comptage en couche mince. Les résultats sont donnés en c.p.m. (coups par minute).

. pour le [^{3}H], avec un scintillateur Nuclear Chicago en utilisant un mélange scintillant à base de toluène pour les produits solubles dans les solvants organiques ou à base de dioxanne (liquide de Bray(22)) pour les produits solubles dans l'eau. On évalue le quenching et les résultats obtenus sont donnés en d.p.m. (désintégrations par minute).

- Les chromatographies couche mince ont été faites sur des plaques de gel de silice fluorescent Prolabo ou Merck.

- Les points de fusion ont été pris sur microscope Köfler à platine chauffante.

- Les spectres U.V. ont été pris sur un spectrophotomètre Shimadzu et les spectres I.R. sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Infracord 237 en utilisant des petites pastilles de KBr (1 mg de produit pour 300 mg de KBr).

- Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Perkin Elmer.

- Les spectres R.M.N. ont été pris sur un spectromètre Jeol à 60 MC , la référence utilisée étant le tétraméthylsilane.

I - SYNTHESE DE CYTIDINE 5'-MONOPHOSPHATE [2'-^{3}H]

1. SYNTHESE D'URIDINE [2'-^{3}H] PAR REDUCTION DU DITRITYL-O-3',5' CETO-2' URIDINE (Ia) AVEC LE BOROHYDRURE DE LITHIUM [^{3}H]

8 µmoles de Ia (6 mg) sont dissoutes dans 5 cc d'eau-alcool (1;1) contenant 300 mc de borohydrure de lithium [^{3}H] (8 µmoles). Le mélange est laissé en contact une nuit à la température ambiante, puis évaporé à sec, repris par le méthanol et de nouveau évaporé à sec. Le produit est ensuite détritylé par traitement à l'acide acétique à 80% (2 cc) pendant 3 heures à 100°. L'acide acétique est alors évaporé et le résidu sec extrait à l'eau avec 3 fois 2 ml. La solution aqueuse est déminéralisée par passage sur Dowex 50H$^+$, l'éluant évaporé à sec et repris deux fois successivement par le méthanol pour éliminer le borate de méthyle. Le résidu, porteur d'une activité de 100 mc environ est repris et conservé dans de l'eau saturée de benzène (3 cc) à 0°.

Par chromatographie sur papier Whatman n° III Mm d'un aliquot de cette solution (0,3 ml) dans le système Butanol ; Ethanol ; H_2O (40 ; 11 ; 19), on sépare nettement deux bandes dont l'une de Rf = 0,38 correspond au témoin d'uridine IIa et dont l'autre plus large de Rf = 0,44 est identifiée à l'arabinosyluracile II'a. IIa est éluée à l'eau. On ajoute à l'éluat (1-2 cc) 40 µmoles (10 mg) d'uridine entraîneur.

2. PASSAGE DE L'URIDINE [2'-^{3}H] A LA CYTIDINE [2'-^{3}H]

a) triacétyl-O-2',3',5' uridine [2'-^{3}H] IIIa

40 µmoles de IIa séchées préalablement sous vide, 0,12 ml d'anhydride acétique plus une goutte de pyridine sont chauffés sur bain-marie bouillant pendant trente minutes jusqu'à ce que la solution soit homogène. Puis le mélange est abandonné un jour à la température ambiante. Le lendemain, la solution est reprise trois fois de suite par 0,15 ml de méthanol et évaporée sous vide de la pompe à eau au dessicateur jusqu'à obtenir un résidu sec.

b) triacétyl-O-2',3',5' thio-4-uridine [2'-^{3}H] IVa

Le résidu sec de IIIa est repris dans 0,2 ml de pyridine anhydre auquel est ajouté 0,3 ml de solution de pentasulfure de phosphore (10 mg) dans la pyridine. Le mélange est chauffé trois heures à reflux sur bain d'huile. Après refroidissement, une goutte huileuse noirâtre se

dépose sur le fond du ballon. Le surnageant rouge marron foncé est pipeté et transvasé dans un ballon de 25 ml, 1 cc d'eau est ajouté et la solution est évaporée à sec quatre fois de suite à l'évaporateur rotatif à une température $t \leq 40°$ en rajoutant de l'eau entre chaque opération pour chasser toute la pyridine.

Le résidu brun est chromatographié sur gel de silice fluorescent (plaque de 0,5 mm) dans le système benzène ; acétate d'éthyle (1 ; 1). La bande jaune de Rf = 0,575 absorbant fortement en U.V. correspond à IVa, le produit de départ, IIIa, migrant au-dessous avec un Rf de 0,17. IVa est élué avec trois fois 50 ml d'alcool bouillant. Le spectre U.V. du produit dans le méthanol : λ max 329 nm , 248 nm - λ min 276 nm. présente les caractéristiques du produit attendu. La quantité de IVa récupérée calculée d'après la densité optique à 329 nm (ε = 19.600), est de 22 μmoles, rendement : 55% par rapport à l'uridine.

c) <u>ammoniolyse de la triacétyl-O-2',3',5' thio-4 uridine [2'-^{3}H]</u>

Les 22 μ moles de IVa sont séchées et reprises par 1,5 cc de méthanol anhydre. Cette solution méthanolique transvasée dans un petit tube est saturée d'ammoniac à 0°. Le tube est introduit dans un plus gros contenant aussi du méthanol saturé d'ammoniac, et le tout est placé dans la bombe fermée hermétiquement et chauffée entre 95 et 108° pendant quarante-huit heures.

Après refroidissement, la solution méthanolique contenant la cytidine [2'-^{3}H] Va est évaporée à sec à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris par 10 cc d'eau. Le spectre U.V. de cette solution aqueuse diluée correspond bien à la cytidine : pH 1 : λ max 280 nm , λ min 242 nm - pH 5 : λ max 271 nm , λ min 251 nm. D'après l'absorption à 280 nm (ε = 13.400 à pH 1), on calcule la quantité de cytidine [2'-^{3}H] : 22 μ moles - rendement d'ammoniolyse : 100%. On mesure la radioactivité sur Va : 600 μc. Activité spécifique : 30 mc/mmole.

3. <u>PHOSPHORYLATION DE LA CYTIDINE [2'-^{3}H] EN CYTIDINE 5'-MONOPHOSPHATE [2'-^{3}H]</u>

a) <u>éthoxyméthylène-O-2',3' cytidine [2'-^{3}H] : VIa</u>

Dans un ballon de 5 ml, 22 μ moles de Va récupérées après ammoniolyse et bien séchées, plus 0,160 ml d'orthoformiate d'éthyle, et 0,080 ml de solution de β cyanoéthylphosphate dans la diméthylformamide

(solution à 1 mmole/ml) sont agités pendant une heure quarante-cinq à la température ambiante. Puis, on ajoute 0,4 ml de pyridine anhydre trois fois de suite en évaporant à sec entre chaque opération au dessicateur.

b) cytidine 5'-monophosphate $[2'-^3H]$: VIIa

On ajoute au résidu dissous dans 0,4 ml de pyridine anhydre 200 µmoles de dicyclohéxylcarbodiimide. Le ballon est bien bouché et abandonné à la température ambiante pour vingt-quatre heures. Puis, après addition de 0,2 ml d'eau, ce qui détruit la dicyclohexylcarbodiimide en excès, le mélange hétérogène est évaporé à sec au dessicateur sur H_2SO_4 et KOH sous vide de la pompe à eau.

Le résidu est traité par 2 cc d'ammoniaque 7M à 60° pendant une heure trente. La solution est filtrée. Le filtrat et les eaux de lavage (10 cc en tout) sont concentrés jusqu'à 2,5 cc. La solution neutre est alors chauffée sur bain-marie bouillant pendant quarante-cinq minutes, puis acidifiée jusqu'à pH 1,5 avec trois gouttes de HCl 4M. Après quarante-cinq minutes, la solution est de nouveau neutralisée avec une goutte d'ammoniaque concentrée et évaporée à sec.

Le résidu obtenu contenant VIIa et Va non phosphorylé est chromatographié sur papier Whatman III Mm dans le système : butanol ; acide acétique ; eau (50 ; 25 ; 25). On repère sur le chromatogramme les deux produits de Rf nettement distincts 0,41 et 0,22. VIIa est élué à l'eau (Rf = 0,22). Le dosage U.V. de l'éluat donne 10 µmoles de VIIa : rendement de phosphorylation 45%.

La solution de cytidine 5'-monophosphate $[2'-^3H]$ (1 cc) est purifiée par chromatographie sur colonne de Dowex $50H^+$ (200-400 mesh - 1 x 18 cm). Les dérivés de l'uridine sont éliminés par simple lavage à l'eau, tandis que VIIa est élué à l'acide acétique 0,2 M. Le produit sort sur 30 cc environ. Les fractions contenant VIIa sont réunies, concentrées. Activité spécifique : 22 µc/µmole. Un aliquot est chromatographié sur papier dans le système borate[*] : il donne une seule tache de Rf = 0,066. Le produit est stocké à -20° en solution dans un mélange eau, alcool.

Une impureté contaminante correspondant à 1% de l'activité totale et dont la zone d'élution suit immédiatement celle de VIIa a été éliminée au cours de l'opération.

---

[*] 20 ml d'acétate d'ammonium 5M pH 9,5
80 ml de tétraborate de sodium saturé
220 ml d'éthanol 0,5 ml d'EDTA 0,5M

II - DEGRADATION DE LA DESOXYCYTIDINE [2'-^{3}H]

1) Désamination nitreuse de la désoxycytidine Ib en désoxyuridine IIb

40 mg de chlorhydrate de Ib (0,15 mmole) sont traités par 120 mg de nitrite de sodium dissous dans 3 ml d'eau et 0,12 ml d'acide acétique glacial pendant trois heures à 60°. La solution une fois refroidie est concentrée sous vide puis déminéralisée par passage sur une petite colonne de Dowex $50H^+$ (200-400 mesh - 10 mEq). Par simple lavage à l'eau, on récupère IIb dans un volume de 25 ml : 0,14 mmole de IIb déterminé par dosage U.V. - rendement 90%. La solution est évaporée à sec à l'évaporateur rotatif à une température $< 35°$. Le résidu sec est repris par trois fois 0,2 ml de pyridine, transvasé à l'aide d'un compte-gouttes dans un ballon de 5 ml et évaporé au dessicateur sous un vide de 18 mm Hg sur H_2SO_4 et KOH.

2) trityl-O-5' désoxyuridine IIIb

Le sirop résiduel est dissous dans 0,25 ml de pyridine anhydre. On y ajoute 45 mg de chlorure de triphénylméthane (0,16 mmole) dissous également dans 0,25 ml de pyridine sèche. Le mélange est chauffé à 100° pendant quarante-cinq minutes, sur bain-marie bouillant, à l'abri de l'humidité, en agitant de temps en temps ; la solution refroidie est ensuite versée goutte à goutte dans un bain d'eau et glace (25 ml environ) agité magnétiquement. L'agitation est poursuivie trente minutes. Le précipité qui se forme est centrifugé, lavé avec 5 cc d'eau froide, recentrifugé et séché (45 mg de produit brut).

Le produit brut contenant du triphénylcarbinol est purifié par chromatographie sur gel de silice fluorescent (plaque préparative de 2 mm) système irrigant : chloroforme ; acétate d'éthyle:1 ; 1. La bande de Rf = 0,24 correspondant à IIIb est éluée sur colonne avec 50 cc d'un mélange chloroforme ; méthanol : 4 ; 1. On récupère 30 mg de IIIb (0,065 mmole).

3) trityl-O-5' mésyl-O-3' désoxyuridine IVb

30 mg de IIIb séchés une nuit sous vide sont dissous dans 0,5 ml de pyridine anhydre. On ajoute à cette solution refroidie à 0° 0,025 ml de chlorure de méthane sulfonyl (0,32 mmole). Le mélange réactionnel est conservé à 0° pendant vingt-quatre heures à l'abri de l'humidité. Le lendemain, une goutte d'eau glacée est ajoutée et, après trente

minutes à 0°, la solution est versée goutte à goutte dans un bain d'eau et glacé (25 ml) agité magnétiquement. On recueille après centrifugation 28 mg de IVb (0,050 mmole). c.c.m. dans le système chloroforme ; acétate d'éthyle : 1 ; 1 une seule tache de Rf = 0,34.

4) trityl-O-5' anhydro-2,3' désoxyuridine Vb

Les 28 mg de IVb dissous dans 5 ml d'alcool absolu contenant 0,5 ml de soude 0,1 M (0,050 mEq) sont chauffés à reflux pendant quarante-cinq minutes. Le contrôle de la réaction par c.c.m. dans le système benzène ; éthanol : 1 ; 1 montre un seul produit de Rf = 0,31, plus une trace du produit de départ IVb de Rf = 0,87. La solution éthanolique est évaporée à sec à l'évaporateur rotatif. Le résidu est trituré avec de l'eau glacée. Le précipité jaune formé est centrifugé, le surnageant éliminé (20 mg de produit brut Vb). Recristallisé dans l'alcool (0,5 ml) : on recueille 14 mg de cristaux. F : 125-160° - pur en c.c.m. - U.V. : 2 épaulements à 250 nm (ε = 6900) et 225 nm (ε = 20.000). On récupère par chromatographie des eaux mères sur plaque de gel de silice (0,25 mm) 0,014 mmole de Vb supplémentaire. Rendement global : 90%.

5) trityl-O-5' didéoxy-2',3' uridinène-2' VIb

A une solution de 7,2 mg de terbutylate de potassium (0,070 mmole) dissous dans 0,2 ml de diméthylsulfoxide redistillé, agitée magnétiquement, est ajouté 0,2 ml de diméthylsulfoxide contenant 14 mg de Vb (0,031 mmole). L'agitation est poursuivie trente minutes à la température ambiante. Le mélange prend une coloration jaune orangée. Au bout d'une demi-heure, 5 ml d'eau et glace finement broyée sont ajoutés au mélange en agitant toujours énergiquement. La solution est neutralisée avec de l'acide acétique 0,05 M en présence de phénolphtaléine. Le précipité qui se forme est centrifugé, séché (7 mg de produit brut) : c.c.m. système chloroforme ; acétate d'éthyle une tache de Rf = 0,53 (VIb) plus trace du produit de départ Vb Rf = 0. Système éthanol ; benzène : 1 ; 1 Rf = 0,87 produit de départ Rf = 0,30. Recristallisé dans l'alcool (0,3 cc) : on recueille 4 mg de cristaux. F : 193-196° - pur en c.c.m. - U.V. : λ max 261 nm ε = 9500 - λ min 242 nm ε = 5400.

6) trityl-O-5' mésyl-O-3' désoxy 2' β D lyxosyluracile IV'b

48 mg de IVb brut, non purifié sur plaque au stade IIIb dissous dans 10 ml d'alcool absolu contenant 0,9 ml de soude 0,1 M (0,09 mEq) sont chauffés à reflux pendant deux heures trente. Le contrôle de la

réaction par c.c.m. dans le système benzène ; éthanol : 1 ; 1 donne une tache principale de Rf = 0,86 accompagnant le produit attendu Vb présent en faible proportion Rf = 0,30. Ce produit de Rf = 0,23 dans le système chloroforme ; acétate d'éthyle : 1 ; 1 alors que Vb ne migre pas, est identifié au trityl-O-5' désoxy-2' β D lyxosyluracile III'b isomère de IIIb et résulte de l'hydrolyse de Vb en milieu basique. III'b est isolé par chromatographie sur gel de silice fluorescent (plaque préparative de 2 mm). Système irrigant : benzène ; éthanol : 1 ; 1. La bande de Rf = 0,86 est élué à chaud avec 3 fois 50 ml d'alcool bouillant : 25 mg de produit après évaporation à sec.

III'b traité par le chlorure de méthane sulfonyl exactement comme il est décrit pour IIIb (cf 3)) conduit à IV'b - en c.c.m. système chloroforme ; acétate d'éthyle Rf = 0,34.

7) <u>trityl-O-5' didéoxy-2',3' uridinène-2' VIb obtenu du trityl-O-5' mésyl-O-3' désoxy-2' β D lyxosyluracile IV'b</u>.

A une solution de 7,2 mg de terbutylate de potassium (0,070 mmole) dissous dans 0,2 ml de diméthylsulfoxide, agitée magnétiquement, est ajouté 0,2 ml de diméthylsulfoxide contenant 8 mg de IV'b (0,014 mmole). L'agitation est poursuivie pendant trente minutes à la température ambiante. Puis on ajoute au mélange réactionnel 5 ml d'eau et glace en agitant toujours énergiquement. La solution est neutralisée avec de l'acide acétique 0,05 M en présence de phénolphtaléine. Le précipité formé est centrifugé à 0°, lavé, séché, puis repris par l'éthanol (0,2 cc). c.c.m. chloroforme ; acétate d'éthyle : 1 ; 1 une seule tache de Rf = 0,53 analogue au produit VIb obtenu à partir de Vb. Le produit de départ Rf = 0,34 a disparu. Système benzène ; éthanol : 1 ; 1 une tache également de Rf = 0,87. On détermine par dosage U.V. (ε à 261 nm = 9500) la quantité de VIb obtenue : 0,0065 mmole.

III - REDUCTION PAR L'HYDRURE DE TRI-n-BUTYLETAIN

1) Purification de l'uridine [2'-^{3}H] IIa

Un aliquot (0,010 ml) de la solution aqueuse initiale contenant l'uridine [2'-^{3}H] (cf cidessus § I -1)) est chromatographié sur papier Whatman n° III Mm dans le système butanol ; éthanol ; eau : 40;11;19. La zone de Rf = 0,38 correspondant au témoin d'uridine (IIa) est éluée à l'eau. On ajoute à l'éluat 10 mg d'uridine entraîneur et IIa est à nouveau chromatographié sur papier dans le système borate (20 ml d'acétate d'ammonium 5 M pH 9,5 - 80 ml de tétraborate de sodium saturé - 220 ml d'éthanol - 0,5 ml d'EDTA 0,5 M). La bande uridine Rf = 0,40 est éluée à l'eau, l'éluat déminéralisé par passage sur Dowex 50H$^+$, évaporé à sec et repris par un mélange alcool ; eau 1 ; 1 (7 cc). L'activité spécifique est déterminée en mesurant la radioactivité sur une solution dosée en U.V. : 0,5 µc/µmole. Un aliquot de 0,2 ml ($\simeq$ 0,7 µc) est ajouté à 12 mmoles (3 g) d'uridine entraîneur.

2) Carbonate-2',3' uridine [2'-^{3}H] IIc

3 g de IIa (12 mmoles) séchés une nuit sous vide et 2,4 g de paranitrophénylchloroformiate (12 mmoles) sont dissous dans 30 cc de pyridine anhydre et agités magnétiquement pendant cinq jours à la température ambiante. Après élimination de la pyridine sous pression réduite, le résidu est repris dans l'acétone pour être chromatographié sur colonne de gel de silice (Merck - 70-230 mesh - 3 x 40 cm). On constate qu'environ un tiers du résidu ne parvient pas à se dissoudre, forme une gomme, puis précipite dans l'acétone. Ce qui est dissous est chromatographié et élué à l'acétate d'éthyle. En tête passe le paranitrophénol (1,2 g - 70%), puis dans les fractions suivantes traînant sur un grand nombre de tubes le produit IIc. Après évaporation du solvant, on en récupère 1,15 g (36%); c.c.m. · système méthanol ; chloroforme : 1 ; 4 IIc Rf = 0,52 - IIa Rf = 0,21. Chromatographie sur papier système n-butanol ; eau ; acide acétique : 5;3;2 IIc Rf = 0,60 IIa Rf = 0,50. F : 115-120° I.R. : 3400 cm^{-1}, NH - 1800 cm^{-1}, C = O carbonate - 1685 cm^{-1}, C = O uridine - Absence de NO_2 (1335-1520 cm^{-1}).

3) Anhydro-2,2' uridine [2'-^{3}H] IIIc

1,15 g de IIc (4,25 mmoles) sont traités par 80 mg de carbonate de sodium dans 2 ml de diméthylformamide à 150° pendant trente minutes. Après refroidissement, la solution est triturée avec de l'éther ;

on obtient un précipité gommeux qui est recristallisé dans l'alcool à 95% : 222 mg - F : 240-244°; plus 171 mg des eaux mères - F : 234-241° (total 40%). U.V. (éthanol $c = 2,1.10^{-5}$ M) λ max 225-250 nm ε = 9500-8070 - λ min 238 nm, - épaulement à 270 nm - échantillon préparé selon la voie classique F : 244-248°. U.V. (éthanol $c = 4,4.10^{-5}$M) λ max 225-250 nm ε = 9470-7750 - c.c.m. · système irrigant méthanol ; chloroforme : 1 ; 4 Rf = 0,14. Dans les eaux mères une tache importante Rf = 0,27 identifié au produit d'ouverture II'a.

4) Bromo-2' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] IVc

370 mg de IIIc (1,63 mmoles) sont dissous dans 10 ml d'acide trifluoroacétique saturé d'HBr à 0° et laissés en contact, soigneusement bouchés, quatre jours à la température ambiante. La solution est évaporée à sec sous pression réduite, la mousse résiduelle triturée avec de l'éther de pétrole et le résidu repris par l'éthanol. IVc cristallise à partir d'éthanol ; éther de pétrole : 365 mg (75%). F : 184-190°. Spectre U.V. (éthanol $c = 0,95.10^{-5}$ M) λ max : 259 nm ε = 10.100 - λ min : 230 nm ε = 2730 - c.c.m. système : méthanol ; chloroforme : 1 ; 4 Rf = 0,57.

5) dibenzoyl-O-3',5' bromo-2' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] Vc

360 mg de IVc (1,17 mmoles) dissous dans 8 ml de pyridine sèche et 0,270 ml de chlorure de benzoyle (2,34 mmoles) sont chauffés une nuit à 55°. La solution refroidie est versée dans un mélange eau et glace (100 ml) ; le précipité qui se forme est filtré, séché : 560 mg produit brut repris dans l'éthanol. En c.c.m. dans le système chloroforme ; acétate d'éthyle : 1 ; 1, le produit donne une tache principale Rf = 0,58, Vc, plus des produits secondaires Rf = 0,22 dérivé monobenzoylé, Rf = 0,79 dérivé tribenzoylé, le produit de départ IVc Rf = 0,09 ayant disparu. L'essai de cristallisation du produit dans l'alcool étant infructueux, on purifie Vc par chromatographie sur colonne de gel de silice Merck (35 g - 70 → 200 mesh) avec pour éluant chloroforme ; acétate d'éthyle : 1 ; 1. Les fractions correspondant à Vc sont réunies, évaporées à sec : 367 mg (61%) recristallisé dans l'alcool : 309 mg F : 167-169° - pur en c.c.m.

- U.V. (éthanol $c = 0,64.10^{-5}$M) λ max 231 nm , caractéristique des benzoyl , ε = 28.700 - 257 nm , caractéristique de l'uridine , ε = 12.400 - léger épaulement à 280 nm.

- I.R. : 3400 cm^{-1}, NH - 1730 cm^{-1}, C = O ester - 1685 cm^{-1}, C = O uridine - 1260 cm^{-1}, C - O benzoate - 710 cm^{-1}, benzoate monosubstitué.

- pouvoir rotatoire : (C = 1, DMF) $\alpha_D^{25} = -23,5°$

- R.M.N. (C_5D_5N)

NH, singulet $\delta = 8,80$ ppm
4H des groupements benzoyl, massif, $\delta = 8,30$ ppm
6H des groupements benzoyl, massif, $\delta = 7,55$ ppm
H5, doublet $\delta = 5,94$ ppm, $J_{5,6} = 8,25$ c/s
H6, doublet $\delta = 8,06$ ppm, $J_{5,6} = 8,25$ c/s
H1', doublet $\delta = 6,93$ ppm, $J_{1',2'} = 5,6$ c/s
H2', $\delta = 5,70$ ppm
H3', massif $\delta = 6,17$ ppm
H de pyridine $\delta = 7,30$ ppm

Preuves de structure : formation du dibenzoyl-O-3',5' anhydro-2,2' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] IIIc à partir du dibenzoyl-O-3',5' bromo-2' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] Vc

50 mg de Vc (0,1 mmole), 50 mg de benzoate de sodium et 0,9 g d'acétamide fondu sont chauffés pendant vingt minutes à 100-105°. Le mélange est ensuite versé dans un bain d'eau et glace (50 ml) et le précipité formé, filtré et séché : 25 mg (60%) - c.c.m. système chloroforme; acétate d'éthyle : 1 ; 1, III'c Rf = 0, Vc Rf = 0,58 a disparu - système benzène ; éthanol : 1 ; 1 III'c Rf = 0,70. U.V. (éthanol ; eau) λ max 232 nm. $\varepsilon \frac{230}{260} = 4,55$. I.R. absence de NH à 3400 cm^{-1} - 1640 cm^{-1}, C = O uridine - 1730 cm^{-1}, C = O ester - 1250 cm^{-1}, C - O benzoate - 1535 cm^{-1}, C - N - 710 cm^{-1}, benzoate monosubstitué. F : 263-266° produit cristallisé (référence 262°).

6) dibenzoyl-O-3',5' désoxy-2' uridine [2'-^{3}H] VIc

309 mg de Vc (0,6 mmole) et 36 mg de $\alpha\alpha'$ azobisisobutyronitrile (0,2 mmole) sont dissous dans 30 ml de benzène sec et traités par 0,270 ml d'hydrure de tri-n-butylétain (1,2 mmole). Le mélange est chauffé à reflux pendant trente minutes. En c.c.m. dans le système chloroforme ; acétate d'éthyle : 1 ; 1 on observe deux taches : l'une Rf = 0,37 correspondant au produit de réduction VIc et l'autre migrant plus Rf = 0,58 au produit de départ Vc. Le mélange réactionnel est évaporé à sec et le produit VIc est récupéré par chromatographie préparative

sur plaque de gel de silice (2 mm épaisseur) dans le système ci-dessus, suivie d'une élution sur colonne avec le mélange chloroforme ; méthanol : 4 ; 1 : 85 mg de VIc - F : 217-220°. Rendement : 33% - U.V. (éthanol $c = 1,4.10^{-5}$ M) λmax = 231 nm ε = 19.500 - 260 nm ε = 8.000. Les ε mesurés sont inférieurs de 30% aux ε théoriques :

ε à 230 nm 19500 pour 29040
ε à 260 nm 8000 pour 11750

Le produit est contaminé de silice.

- R.M.N. (C_5D_5N)

NH, singulet δ = 8,80 ppm
4H des groupements benzoyl, massif δ = 8,25 ppm
6H des groupements benzoyl, massif δ = 7,55 ppm
H5, doublet δ = 5,87 ppm, J 5,6 = 7,5 ppm
H6, doublet δ = 7,90 ppm, J 5,6 = 7,5 ppm
H1', triplet δ = 6,87 ppm
H2', quadruplet δ = 2,88 ppm
H3', multiplet δ = 5,95 ppm
H4', massif δ = 5,05 ppm
2H5',doublet δ = 4,82 ppm
H de pyridine, δ = 7,30 ppm

7) <u>désoxy-2' uridine</u> $[2'-^3H]$ <u>IIb</u>

80 mg de VIc (0,18 mmole) sont dissous dans 10 ml de méthanol contenant du méthylate de sodium à la concentration 0,03 M. La solution est abandonnée la nuit à la température ambiante. Le lendemain en c.c.m. système chloroforme ; acétate d'éthyle : 1 ; 1 VIc Rf = 0,37 a disparu, IIb ne migre pas - Système isopropanol ; ammoniaque ; eau : 7 ; 1 ; 2 IIb Rf = 0,67. La solution est déminéralisée par addition de Dowex $50H^+$ (0,3 g), filtrée, évaporée à sec ; le résidu est repris par l'eau (10 cc) et le benzoate de méthyle extrait par trois fois avec 2 ml d'éther ; la phase aqueuse est évaporée à sec, séchée sous vide : 35 mg de IIb. La quantité exacte de désoxyuridine $[2'-^3H]$ est déterminée de façon précise par dosage U.V. : 0,12 mmole.

IV - HYDROLYSE DE LA DESOXYCYTIDINE

La désoxycytidine [U-^{14}C] (0,43 µmole) à laquelle on ajoute 0,25 mmole d'acide lévulique entraîneur (31 mg) est hydrolysé par H_2SO_4 M (1 ml) pendant huit heures à 100°. L'acide lévulique est recueilli par extraction continue à l'éther pendant quarante-huit heures. La phase éthérée est à son tour extraite par NaOH 0,1 M et la solution alcaline concentrée déminéralisée par passage sur Dowex $50H^+$. La solution d'acide lévulique effluente est neutralisée exactement avec NaOH 0,1 M jusqu'à pH 8, puis évaporée à sec à l'évaporateur rotatif.

Le lévulate est caractérisé par sa semicarbazone : les 30 mg de lévulate de sodium sont dissous dans 2 ml d'eau auxquels on ajoute 34 mg de chlorhydrate de semicarbazide. La semicarbazone cristallise rapidement. Les cristaux sont centrifugés et séchés. La semicarbazone est recristallisée dans l'eau. F : 195°.

V - DEGRADATION DU RIBOSE

a) Oxydation périodique du ribose et du ribitol

7,5 mg de ribose dissous dans 1 ml d'eau sont traités par 0,75 ml de bicarbonate de sodium M et 1,1 ml de périodate 0,3 M pendant une heure à la température ambiante. On ajoute ensuite 1,5 ml d'acide chlorhydrique M et 1 ml d'une solution d'arsenite de sodium 1,2 M. Puis le mélange est tamponné par addition d'1 ml d'une solution d'acétate de sodium M et ajusté à pH6 avec de l'acide chlorhydrique concentré ; on ajoute alors 0,5 cc de solution de dimédon dans l'alcool à 8%. Immédiatement le précipité se forme ; il est filtré, lavé à l'eau, séché sur P_2O_5. F : 187-188°.

Dans le cas du ribitol, la quantité de formaldéhyde formée est double, on ajoute donc pour le complexer 1 cc de solution de dimédon à 8%.

b) Réduction du ribose en ribitol

22 mg de ribose dissous dans 1 ml d'eau sont traités par 12 mg de borohydrure de sodium. Le mélange est abandonné la nuit à la température ambiante. L'excès de réactif est ensuite détruit par l'acide acétique M (0,2 cc), la solution déminéralisée par passage sur colonne Dowex $50H^+$, puis évaporée à sec. Le résidu est repris trois fois par du méthanol pour éliminer le borate de méthyle. Le ribitol est cristallisé dans l'alcool. F : 97-98°.

VI - DEGRADATION DU DESOXYRIBOSE : DEGRADATION DE L'ACIDE LEVULIQUE

a) Réaction à l'iodoforme

10 mg de semicarbazone de l'acide lévulique sont dissous dans NaOH 2 M (0,5 cc) et la solution chauffée trois quarts d'heure au bain-marie. Après refroidissement, on ajoute une solution d'iode dans l'iodure de potassium (I_2 : 50 mg et IK : 100 mg par cc - 1,3 cc). L'iodoforme qui précipite est centrifugé après quatre heures, lavé, séché. F : 124°.

b) Réduction de l'acide lévulique en acide valérique

12,3 mg de semicarbazone de l'acide lévulique sont traités par 0,5 ml de réactif réducteur (400 mg de KOH - 0,3 ml d'hydrate d'hydrazine dans 3,8 ml de glycol) dans un tube scellé et chauffés pendant quatre heures à 180°. Après avoir refroidi et acidifié, on entraîne à la vapeur l'acide valérique, neutralise le distillat et évapore à sec.

c) Dégradation de Schmidt sur l'acide valérique

Quelques mg du sel de sodium de l'acide valérique sont traités par 0,1 ml d'acide de Nordhausen et 10 mg de NaN_3. Le CO_2 qui se dégage est piégé par la baryte et isolé en tant que carbonate de baryum.

Deuxième Partie : ETUDES DE BIOSYNTHESE

INTRODUCTION

Chapitre I : BIOSYNTHESE DES DESOXYRIBONUCLEOTIDES CHEZ ESCHERICHIA COLI

I - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES GENERALES

II - PROBLEME DE LA STEREOCHIMIE

III- MISE EN EVIDENCE DE LA REDUCTION

IV - RESULTATS ET DISCUSSION :

A - Mise en évidence de l'activité de la ribonucléotide réductase

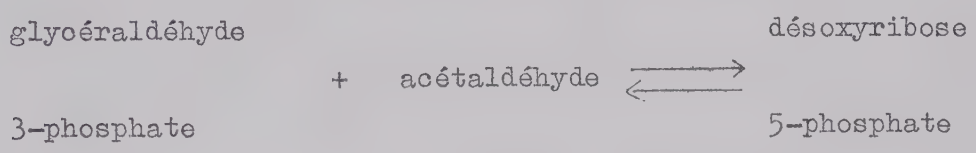
B - Conservation du rapport d'activité Base/Sucre

C - Localisation du tritium ; stéréochimie de la réduction

V - METHODES EXPERIMENTALES

I N T R O D U C T I O N

La biosynthèse du désoxyribose, constituant du DNA, a été étudiée en parallèle à celle du ribose, constituant du RNA. Toutefois, l'origine commune des deux sucres ne semble pas toujours clairement établie. Deux voies possibles de biosynthèse du désoxyribose ont été mises en évidence in vitro. La première, présumée par RACKER (20), faisait intervenir la désoxyribose 5-phosphate aldolase catalysant la réaction :



Mais en définitive cette enzyme n'apparaît pas avoir un grand rôle, in vivo, quant à la synthèse ; elle catalyserait plutôt la réaction inverse, de dégradation du désoxyribose.

La seconde voie métabolique fait découler directement le désoxyribose du ribose. De nombreuses expériences réalisées in vivo en utilisant des traceurs isotopiques appuient cette hypothèse. Escherichia coli (21) et Candida utilis (19) cultivées en présence de précurseurs marqués, présentent même répartition de radioactivité sur les carbones des deux sucres, isolés respectivement du RNA et du DNA. De même, après administration à des rats de cytidine uniformément marquée, les désoxynucléotides pyrimidiques isolés ont un rapport d'activité base/sucre identique à celui de la cytidine injectée (23). Ces dix dernières années, ces résultats ont été confirmés par l'isolement de systèmes acellulaires capables de réduire in vitro les ribonucléotides en désoxyribonucléotides, obtenus hautement purifiés à partir des bactéries Escherichia coli (24) et Lactobacillus leichmannii (25), bruts et plus ou moins purifiés à partir de tissus animaux, notamment de l'embryon de poulet (26) et de l'hépatome de NOVIKOFF, forme à Ascites du rat (27).

Dans le cadre de ces recherches, nous nous sommes intéressés au mécanisme d'action de la ribonucléotide diphosphate réducteur, isolée de Escherichia coli : plus précisément nous avons examiné la stéréochimie de la réduction (28).

Parallèlement, nous nous sommes orientés aussi vers les tissus animaux. A partir de l'hépatome de ZAJDELA, tumeur du rat, à croissance ascitique, comparable à l'hépatome de NOVIKOFF, nous avons mis en évidence un système enzymatique analogue qui a été partiellement purifié. Nous avons étudié également la stéréochimie de sa réduction.

D'autre part, préalablement sur des cellules néoplasiques en culture, nous avons fait une étude comparée de la biosynthèse du ribose et du désoxyribose (29).

C H A P I T R E I

BIOSYNTHESE DES DESOXYRIBONUCLEOTIDES CHEZ ESCHERICHIA COLI

I - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

La ribonucléotide diphosphate réductase de Escherichia coli catalyse la réduction des quatre nucléotides : cytidine-, uridine-, adénosine-, guanosine-diphosphate, en 2'-désoxyribonucléotide correspondant. L'enzyme est composée de deux sous-unités. Ces sous-unités sont inactives séparément, mais elles se combinent en présence de Mg^{++} pour former un complexe enzymatiquement actif (30). Elles ont été obtenues pratiquement pures et leur poids moléculaire a été déterminé : il est de 160.000 à 200.000 pour B_1, de 78.000 pour B_2.

Le donneur d'hydrogène pour la réduction est une petite protéine stable à la chaleur, appelée thiorédoxine (31), porteur d'un résidu cystine, régénérée sous forme réduite par l'intermédiaire d'une enzyme spécifique, la thiorédoxine réductase, en présence de NADPH (32-33). In vitro, avec l'enzyme purifiée, des dithiols tels que l'acide lipoïque ou le dithioérythréitol peuvent remplacer le système thiorédoxine et jouer le rôle de donneur d'hydrogène.

La ribonucléotide diphosphate réductase de Escherichia coli est soumise d'une part à un système contrôle répresseur gouverné par la concentration intracellulaire d'un dérivé de la thymine. Ceci a été mis en évidence chez des mutants thymine moins (34). En cultivant ces mutants sur un milieu contenant des quantités limitantes de thymine, on parvient à déréprimer et à obtenir des quantités dix fois plus importantes d'enzyme. Celà a présenté un grand intérêt et facilité les travaux concernant la purification de l'enzyme.

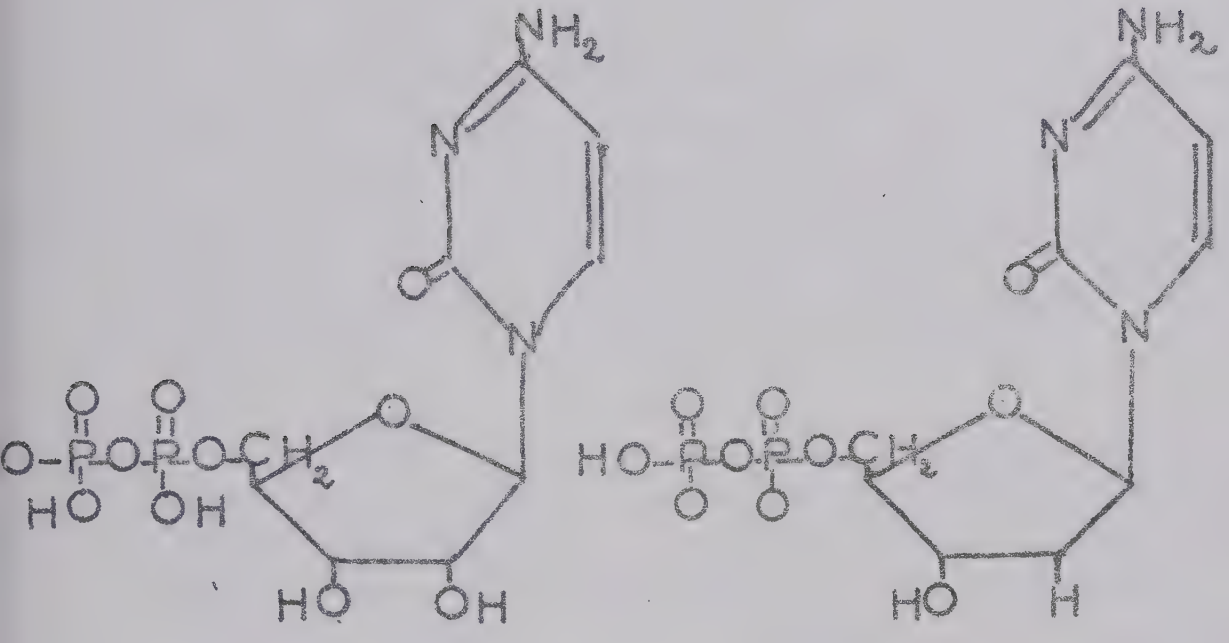
D'autre part, le système est soumis, suivant la théorie de MONOD, à une régulation allostérique par les nucléosides triphosphates qui influencent la spécificité du substrat vis-à-vis de l'enzyme (35-36). Les effecteurs allostériques stabilisent différents états conformationnels de l'enzyme, propres à la réduction des différents substrats. Ainsi, les ribonucléotides pyrimidiques occupent le site catalytique et sont réduits

en présence d'ATP, qui est lié alors au site allostérique de l'enzyme, les puriques en présence de dGTP, les puriques comme les pyrimidiques en présence de dTTP qui est un effecteur allostérique positif pour les quatre nucléotides. Par contre, dATP se révèle être un inhibiteur allostérique : en se liant à l'enzyme, il stabilise un état totalement inactif de l'enzyme vis-à-vis de la réduction.

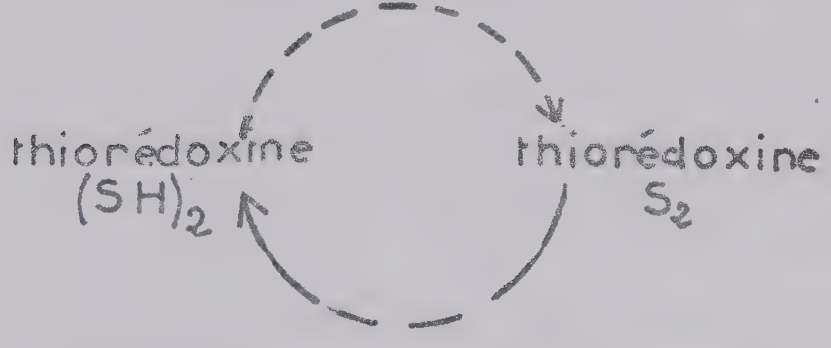
La protéine B_1 est la sous-unité régulatrice de l'enzyme : elle est capable de fixer ces nucléosides triphosphates connus pour jouer le rôle d'effecteur allostérique. Elle possède au total quatre sites de liaison divisés en deux classes : les uns interviennent dans la régulation de l'activité totale de l'enzyme, les autres influencent la spécificité du substrat (37).

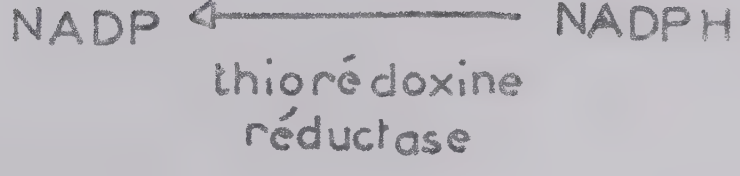
La protéine B_2 semble être la sous-unité catalytique de l'enzyme, bien qu'elle ne montre pas d'activité catalytique par elle-même. Elle contient deux atomes de fer par molécule (38) liés assez fortement à l'apoprotéine puisqu'ils ne sont pas perdus au cours des nombreuses étapes de purification. Le spectre d'absorption U.V. de B_2 présentant deux pics à 360 et 410 nm dépend de la présence de Fe^{++}. Le fer est indispensable à l'activité de l'enzyme. Il ne semble pas toutefois jouer un rôle dans le maintien de la structure quaternaire de l'enzyme, il participerait plutôt au mécanisme de réduction proprement dit.

Schéma de réduction
de cytidine diphosphate



enzymes $B_1 + B_2$
ATP Mg^{++}





thiorédoxine
réductase

II - PROBLEME DE LA STEREOCHIMIE

Le mécanisme chimique de la réduction reste mal connu. On ne sait rien de la façon dont l'hydrogène remplace l'hydroxyle, du mécanisme par lequel le dithiol peut réduire l'alcool secondaire, de ce que devient l'atome d'oxygène.

Différentes expériences ont été faites en vue d'expliquer le mode d'action de l'enzyme. LARSSON réalise la réaction enzymatique dans de l'eau tritiée ; les hydrogènes des groupes SH de la thiorédoxine s'échangeant rapidement avec le tritium de l'eau, l'isotope se trouve introduit sur le désoxyribose et par dégradation chimique du sucre LARSSON a pu prouver que tout le tritium introduit se retrouvait sur le carbone C-2' (39).

REICHARD a répété cette expérience en opérant dans de l'eau lourde (40). Le spectre R.M.N. de la désoxycytidine deutérée synthétisée enzymatiquement dans ces conditions à partir de cytidine diphosphate, montre la présence d'un seul atome de deutérium en position 2'. De plus, l'examen du couplage J 2',3' et la comparaison de la valeur trouvée avec celle calculée par LEMIEUX (41) et JARDETZKY (42) dans le cas de la thymidine et de la désoxyuridine non deutérées ont permis à l'auteur de conclure à l'introduction du deutérium au cours de la réduction, uniquement en position trans par rapport au noyau pyrimidique, c'est-à-dire avec rétention de la configuration du carbone C-2'. Cependant, REICHARD lui-même fait quelques réserves. Les constantes trouvées pour J 2',3' et J 2",3' étant quand même assez différentes de celles calculées par LEMIEUX et JARDETZKY avec en plus certaines incertitudes sur les angles de liaison (6,5 et 4,3 contre 7,3 et 3,3 cps), il signale que le résultat obtenu ne peut être considéré comme absolument définitif.

C'est là le problème de stéréochimie que nous avons eu pour objectif de trancher. Nous nous sommes donc proposés de préparer le substrat de l'enzyme, la cytidine 5'-monophosphate, spécifiquement tritié en 2', ce qui a été décrit dans la première partie (cf § I). Après avoir réalisé l'essai enzymatique, avec ce substrat tritié, nous avons appliqué à la désoxycytidine $[2'-{}^{3}H]$ obtenue, la dégradation mise au point et décrite également ci-dessus (cf § II - A) permettant de localiser le tritium.

III - MISE EN EVIDENCE DE LA REDUCTION

Nous avons travaillé avec Escherichia coli K12 fournies congelées par le laboratoire de Chimie Microbienne du C.N.R.S. à Marseille.

La méthode employée pour mettre en évidence l'activité de la ribonucléotide réductase est celle de REICHARD (43) : elle consiste à utiliser un substrat radioactif et à déterminer, après incubation enzymatique, une quantité connue de désoxyribonucléotide entraîneur une fois ajoutée, la radioactivité qui lui est attachée.

Nous avons obtenu des résultats comparables à ceux publiés avec extraits bruts. Nous avons reproduit la première étape de purification (44) : élimination des acides nucléiques et concentration de l'enzyme par précipitation en acidifiant à pH 5. La fraction qui précipite est la fraction B brute, contenant les enzymes B_1 et B_2 et la thiorédoxine réductase. La fraction surnageante est la fraction A renfermant les kinases, phosphorylant les nucléosides monophosphates en diphosphates et la thiorédoxine. Mais nous n'avons pu reproduire les étapes ultérieures de purification consistant en une série de fractionnements successifs sur colonne de DEAE cellulose, Sephadex, TEAE cellulose. Cependant, pour notre travail il n'était pas absolument indispensable d'avoir un système purifié et nous y avons renoncé.

C'est la cytidine qui est, des quatre nucléotides, le meilleur substrat. Du fait que nous utilisions les fractions A et B brutes, nous pouvions prendre comme substrat indifféremment le mono ou le diphosphate. D'ordinaire, conformément aux essais publiés, nous avons utilisé la cytidine diphosphate $[2\text{-}^{14}C]$, c'est-à-dire marquée uniquement sur la base.

Mais, avec un tel marquage sur le substrat, on ne peut distinguer une réduction de nucléotide en désoxyribonucléotide d'un transfert de base sur le désoxyribose. Aussi, avant d'entreprendre la manipulation avec la cytidine 5'-monophosphate $[2'\text{-}^{3}H]$, d'autant plus que nous travaillions avec des fractions brutes, nous avons démontré l'action de la ribonucléotide diphosphate réductase : à partir de la cytidine 5'-monophosphate $[U\text{-}^{14}C]$ uniformément marquée sur la base et sur le sucre, nous avons montré sur la désoxycytidine radioactive recueillie la conservation du rapport d'activité base/sucre, en appliquant la dégradation décrite ci-dessus (cf Méthodes chimiques - § II - C).

IV - RESULTATS ET CONCLUSION

A - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE DE LA RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE

Avec les fractions A et B brutes, dans les conditions standard précisées ci-dessus, nous avons récupéré une activité totale sur la désoxycytidine 5'-monophosphate [2-^{14}C] de 10.000 cpm environ, mesurée au compteur sur des fractions aliquot en constatant une superposition parfaite de la courbe d'absorption U.V. et de celle de radioactivité, tracées en fonction du numéro des fractions recueillies au bas de la colonne Dowex $50H^+$. Un essai enzymatique identique, mais utilisant cette fois le surnageant des fractions A et B bouilli, ne nous a donné aucune activité sur les fractions désoxycytidine.

Dans de telles conditions, 0,5 mμmole de substrat est donc réduite enzymatiquement.

B - CONSERVATION DU RAPPORT D'ACTIVITE BASE/SUCRE

Lors de l'essai enzymatique avec la cytidine 5'-monophosphate [U-^{14}C] la comparaison de l'activité totale de la désoxycytidine avec celle portée par la partie sucre, isolée sous forme d'acide lévulique, après hydrolyse acide, a donné les résultats suivants :

	activité totale en cpm		activité spécifique
	déterminée expérimentalement	calculée	
désoxycytidine 5'-monophosphate	14.000		13.850 cpm/µmole
désoxycytidine	10.150		12.100 cpm/µmole
Après addition de 0,50 mmole de lévulate entraîneur			
semicarbazone de l'acide lévulique			
1ère cristallisation	3.430	5.500	6.700 cpm/mmole
2ème cristallisation	3.500		7.000 cpm/mmole

On retrouve donc sur l'acide lévulique 64% de l'activité théorique attendue correspondant aux 5/9 de l'activité totale de la désoxycytidine. Compte tenu du fait que les rendements d'hydrolyse de la désoxycytidine d'une part et de la transformation désoxyribose en acide lévulique d'autre part ne sont pas quantitatifs, ce résultat est tout à fait satisfaisant. Nous en concluons, le rapport d'activité base/sucre étant conservé, que les extraits bactériens catalysent bien la réduction de cytidine phosphate en désoxycytidine phosphate.

C - LOCALISATION DU TRITIUM - STEREOCHIMIE DE LA REDUCTION

Grâce à la forte activité spécifique de 22 mc/mmole obtenue sur la cytidine 5'-monophosphate $[2'-^{3}H]$, nous avons pu faire l'essai enzymatique avec le produit tritié exactement dans les conditions standard précisées pour le test avec la cytidine 5'-monophosphate $[U-^{14}C]$.

Nous avons d'ailleurs, avec les fractions A et B préparées juste avant l'emploi, réalisé deux essais enzymatiques simultanés, utilisant comme substrat l'un, la cytidine 5'-monophosphate $[2'-^{3}H]$, l'autre, la cytidine 5'-monophosphate $[U-^{14}C]$. Dans la suite, les deux essais ont été traités de manière strictement identique et la réduction du substrat a été mise en évidence de la façon décrite. (cf Méthodes expérimentales)

La détermination de radioactivité attachée à la désoxycytidine-5'-monophosphate pour l'essai au tritium a pu également se faire au compteur Frieseke-Hoepfner. En appliquant toujours la même technique, nous avons enregistré, sur chaque fraction correspondant au pic d'élution de dCMP, une certaine activité, activité proportionnelle à la quantité de produit présente, mesurée par la densité optique à 280 nm. Les deux essais ont donné la même quantité de substrat réduite (0,36 m μmole).

La désoxycytidine $[2'-^{3}H]$ obtenue par hydrolyse enzymatique du phosphate a été entraînée avec 40 mg de chlorhydrate de désoxycytidine (0,150 mmole) auxquels nous avons appliqué la dégradation mise au point et permettant de localiser le tritium en position 2'.

L'attaque de IVb par un équivalent de soude dans l'éthanol a donné comme produit prépondérant le produit d'hydrolyse de Vb, le dérivé trityl-O-5' désoxy-2' β D lyxosyluracile III'b : nous avons donc formé VIb en majeure partie à partir de IV'b.

RESULTATS DES MESURES RADIOACTIVES

	caractéristique du produit Rf dans irrigant(1) x	y	quantité totale de produit en µmoles	activité spécifique en dpm/µmole
Trityl-O-5' mésyl-O-3' désoxyuridine IVb	0,30	0,86		126
Trityl-O-5' désoxy-2' β D lyxosyluracile III'b	0,21	0,78	25	137
Trityl-O-5' didéoxy-2',3' uridinène-2' (VIb) obtenu :				
-à partir de l'anhydro Vb	0,53	0,87	1,5	126
-à partir du dérivé III'b	0,53	0,87	6	150

138

(1) Système irrigant x : chloroforme ; acétate d'éthyle : 1 ; 1
y : éthanol ; benzène : 1 ; 1

Nous constatons que les activités spécifiques portées par les produits précurseurs IVb, III'b et le produit insaturé VIb restent constantes. La substitution de l'hydroxyle par l'hydrogène s'est donc faite avec rétention de la configuration du carbone C-2'.

Ces conclusions viennent confirmer celles de REICHARD. Le remplacement du groupe hydroxyle au cours de la réduction serait une réaction de substitution nucléophile impliquant le transfert d'un ion hydrure.

On peut supposer que le groupement hydroxyle du C-2' est éliminé, laissant un carbocation qui, attaqué par l'ion hydrure, aboutit au produit de réduction. L'absence de racémisation serait due à un effet stérique de l'enzyme ne permettant l'attaque de l'ion hydrure que d'un seul côté.

V - METHODES EXPERIMENTALES

a) Préparation des Extraits

Les bactéries Escherichia coli K12 sont conservées congelées à - 20° jusqu'à leur utilisation. Au moment de l'emploi, une quantité pesée de bactéries congelées (6 g) est mise à dégeler dans cinq volumes de tampon TRIS 0,05 M pH8 10^{-3} M mercaptoéthanol (30 ml). La suspension est soumise à la désintégration aux ultrasons dans un sonicateur du type Raythéon pendant trois minutes à 4°. Les débris cellulaires sont ensuite centrifugés dans la centrifuge réfrigérante Sorvall à 20.000 g pendant vingt-cinq minutes entre 0° et 4°. On ajoute goutte à goutte au surnageant agité magnétiquement 5,5 ml d'une solution de sulfate de streptomycine à 5%, ce qui précipite les acides nucléiques. Ceux-ci sont éliminés de nouveau par une centrifugation à 20.000 g pendant dix minutes entre 0° et 4°.

Séparation des fractions A et B

La solution surnageante est acidifiée à 0° avec CH_3COOH M (0,7 ml environ) jusqu'à pH 4,8. Le précipité est centrifugé à 20.000 g pendant cinq minutes toujours à 0° et rapidement redissous dans 6 ml de tampon TRIS 0,05 M pH 7,75 10^{-3} M mercaptoéthanol. La solution ajustée à pH7 constitue la fraction B brute. Le surnageant neutralisé avec 1 ml de NH_4OH M jusqu'à pH 7,8 constitue la fraction A brute.

b) Essais enzymatiques

Le milieu d'incubation comprend dans un volume total de 0,12 ml : 0,5 µmole d'ATP, 1,5 µmoles de $MgCl_2$, 0,15 µmole de NADPH, 0,05 µ mole de substrat : CDP [2-^{14}C] ou CMP [U-^{14}C] ou CMP [2'-^{3}H] d'activité spécifique 20 mc/mmole (1 µc), 50 µl de fraction A brute, 50 µl de fraction B brute. L'incubation dure trente minutes à 37°.

c) Mise en évidence de la réduction de cytidine phosphate

La réduction de CDP et CMP est mesurée par le procédé de REICHARD.

La réaction enzymatique est stoppée par addition de 1 ml de $HClO_4$ M. Les protéines qui précipitent sont centrifugées, le surnageant pipeté et transvasé dans un autre tube à centrifugeuse. On y ajoute une quantité connue d'entraîneur désoxycytidine 5'-monophosphate (1,5 µmoles

environ). La solution est plongée dans un bain-marie bouillant pendant dix minutes pour hydrolyser les liaisons pyrophosphates.

Fractionnement sur Dowex $50H^+$

La solution acide refroidie est neutralisée avec KOH 4M en présence de rouge de phénol comme indicateur. $KClO_4$ précipite à 0° pendant au moins trente minutes. Après centrifugation, la solution surnageante est chromatographiée sur une colonne de Dowex $50H^+$ (0,9 x 16 cm - 200-400 mesh). Les nucléotides monophosphates de la cytidine sont élués par passage d'une solution de CH_3COOH 0,2 M. L'élution est contrôlée en mesurant l'absorption U.V. à 280 nm sur les fractions de 2,5 ml. CMP est élué en premier vers le trentième tube, suivi de dCMP qui sort entre le quarantième et le soixantième tube.

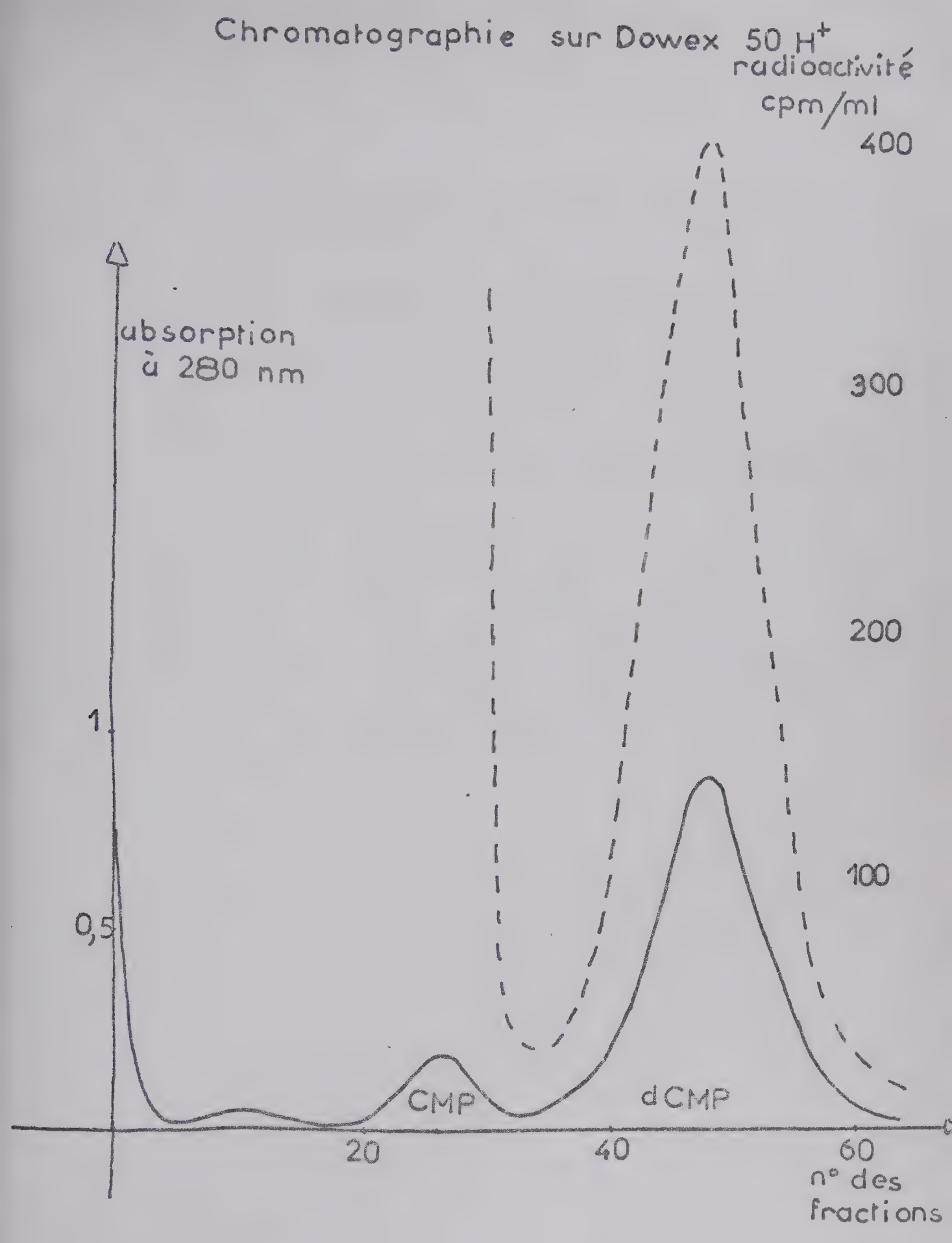
Mesures de radioactivité

Un aliquot de 0,5 ml de chaque fraction correspondant au pic d'élution de dCMP au bas de la colonne Dowex $50H^+$ est évaporé directement sur plaque d'aluminium et passé au compteur proportionnel sans fenêtre Frieseke-Hoepfner. L'absorption U.V. et l'activité des différentes fractions correspondant à dCMP sont mesurées parallèlement ; la superposition des courbes d'absorption U.V. due à la quantité d'entraîneur ajoutée et de radioactivité tracées en fonction du numéro des fractions fournit la preuve que la radioactivité est bien attachée à la désoxycytidine-5'-monophosphate. A partir de l'activité mesurée sur 0,5 ml de chaque fraction, on calcule la radioactivité totale portée sur dCMP. Connaissant l'activité spécifique du substrat, la cytidine phosphate de départ, on en déduit la quantité de désoxycytidine formée et l'activité enzymatique.

d) Isolement de désoxycytidine

Hydrolyse enzymatique de CMP à la phosphatase alcaline (isolée de l'intestin de veau).

1 µmole de dCMP est incubé pendant deux heures à 37° avec 0,5 mg de phosphatase alcaline dans 0,5 ml de tampon TRIS 0,05 M pH 8,95 contenant $MgCl_2$ à la concentration 5.10^{-3}M. La réaction est stoppée par immersion dans un bain-marie bouillant pendant deux minutes. La désoxycytidine est isolée par chromatographie sur papier Whatman n° III dans le système borate de REICHARD : 20 ml d'acétate d'ammonium 5 M pH 9,5 - 80 ml de tétraborate de sodium saturé - 220 ml d'éthanol - 0,5 ml d'EDTA 0,5 M (cytidine Rf = 0,23 - désoxycytidine Rf = 0,75).


Chromatographie sur Dowex 50 H+
radioactivité
cpm/ml
400
300
200
100
absorption
à 280 nm
1
0,5
CMP
dCMP
20
40
60
n° des
fractions
courbe d'absorption UV
courbe de radioactivité

Chapitre II : BIOSYNTHESE DU DESOXYRIBOSE ET DES DESOXYRIBONUCLEOTIDES DANS LES TUMEURS

I - BIOSYNTHESE DU DESOXYRIBOSE DANS LES CELLULES BHK

A - INTRODUCTION AU PROBLEME DE LA COMMUNAUTE D'ORIGINE DU RIBOSE ET DU DESOXYRIBOSE

B - RESULTATS EXPERIMENTAUX. DISCUSSION - CONCLUSION

C - METHODES EXPERIMENTALES

II - BIOSYNTHESE DES DESOXYRIBONUCLEOTIDES DANS L'HEPATOME DE ZAJDELA

A - INTRODUCTION

B - RESULTATS EXPERIMENTAUX

C - DISCUSSION ET CONCLUSION :

1. Mise en évidence de l'activité de la ribonucléotide réductase - propriétés du système
2. Conservation du rapport d'activité Base/Sucre
3. Stéréochimie de la réduction

D - METHODES EXPERIMENTALES

C H A P I T R E II

BIOSYNTHESE DU DESOXYRIBOSE ET DES DESOXYRIBONUCLEOTIDES DANS LES TUMEURS

I - BIOSYNTHESE DU DESOXYRIBOSE DANS LES CELLULES BHK

A - INTRODUCTION AU PROBLEME DE LA COMMUNAUTE D'ORIGINE DU RIBOSE ET DU DESOXYRIBOSE

Lorsque nous avons entrepris ce travail, il était généralement admis que le désoxyribose se formait par réduction directe du ribose ; cependant certains résultats anormaux avaient été publiés pour les tissus animaux.

Ainsi, SCHREEVE constate dans le foie de rat en régénération après hépatectomie, des différences de marquage entre le ribose et le désoxyribose après injection de glycine [^{14}C], suggérant qu'une partie au moins du désoxyribose ne doit pas provenir directement du ribose ou d'un de ses précurseurs (45).

GROSH et BERNSTERN étudiant la biosynthèse du désoxyribose *in vivo* avec $NaHCO_3$ [^{14}C] comme traceur, chez le rat à différents âges et soumis à différents régimes, comparent le marquage des deux sucres isolés des acides nucléiques de la peau et du foie. Ils en concluent que dans les tissus jeunes la formation de désoxyribose se fait directement par réduction du ribose, mais que, dans les tissus plus vieux, il doit exister une autre voie de biosynthèse (46). De même, HORECKER, pour les cellules d'un carcinome humain, souches Hela, cultivées en présence de glucose [1-^{14}C] , trouve une répartition d'activité sur les carbones des deux sucres très différente : sur le ribose 50% sur le carbone C-1 et 35% sur le carbone C-5 et parallèlement sur le désoxyribose, l'inverse, 38% sur le carbone C-1 et 53% sur le carbone C-5 (47).

Reprenant ces travaux, nous avons étudié la biosynthèse du désoxyribose *in vivo* dans les cultures de cellules BHK, lignée de cellules du rein d'embryon de hamster devenues spontanément néoplasiques, avec, comme traceur, le glucose [1-^{14}C] .

On inocule aux cellules BKH, au cours de leur croissance, 50µc de glucose [1-^{14}C]. La croissance terminée, les cellules sont recueillies. On en extrait les acides nucléiques RNA et DNA. Les proportions relatives en RNA et DNA sont déterminées par dosage colorimétrique, dosage du ribose par le réactif à la phloroglucine, dosage du désoxyribose par le réactif de DISCHE (48). Puis, ceux-ci, hydrolysés, libèrent le ribose et l'acide lévulique, produit de dégradation du désoxyribose en milieu acide. Les deux sucres sont dégradés chimiquement selon les méthodes décrites (cf 1ère partie - § II - D - E) pour libérer leurs carbones C-1 et C-5 dont les activités sont comparées.

B - RESULTATS EXPERIMENTAUX - DISCUSSION - CONCLUSION

Pour le ribose, l'activité a été déterminée sur le ribitol, sur le dérivé dimédon C-5 , sur le dérivé dimédon C-1 + C-5 .

Pour le désoxyribose, l'activité a été déterminée sur la semicarbazone de l'acide lévulique, sur l'iodoforme, sur le carbonate de baryum.

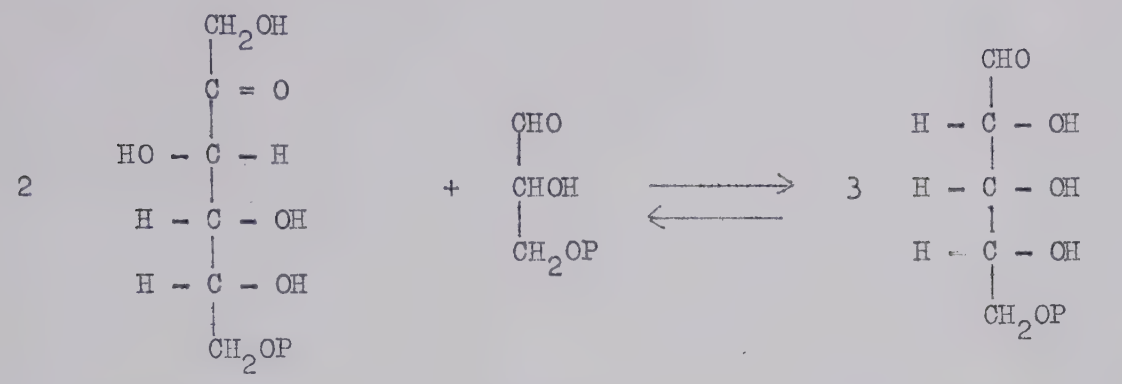
L'activité spécifique du ribitol était de 28000 dpm/mmole et celle du lévulate environ quatre fois plus faible.

	Total	C-1	C-5
Ribose	Ribitol 100%	HCHO dimédon 62%	HCHO dimédon 38%
Désoxyribose	Semicarbazone de l'acide lévulique 100%	$BaCO_3$ 68,5%	CHI_3 33%

De ces résultats, il ressort que la totalité de l'activité du ribose et du désoxyribose se retrouve sur les carbones C-1 et C-5, ce qui exclut la possibilité de marquage d'autres carbones.

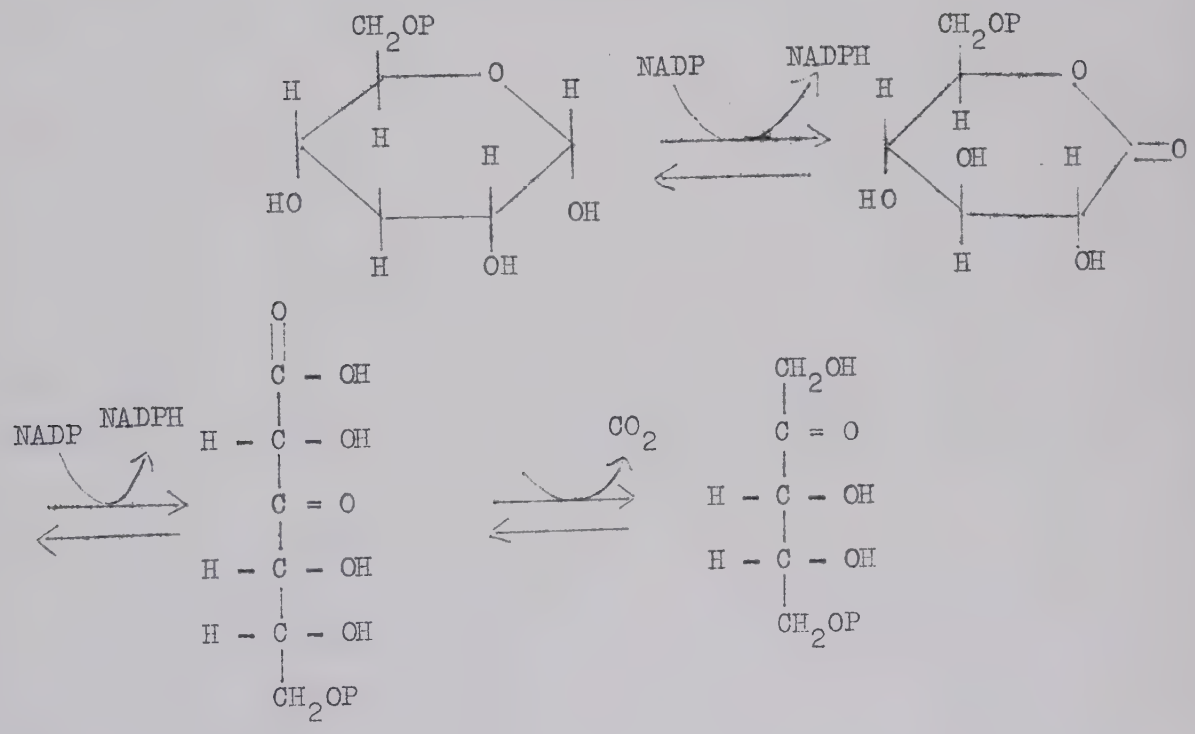
Le marquage du carbone C-1 de l'un et l'autre sucre, et le rapport C-1/C-5 voisin de 2 impliquent que la principale voie de

biosynthèse du ribose dans ces cellules est la voie non oxydative trans-cétolase - transaldolase :



2 Fructose 6-phosphate + glycéraldéhyde 3-phosphate ⟷ 3 ribose 5-phosphate

En effet, à partir de glucose $\left[1\text{-}^{14}C\right]$ la voie oxydative conduirait à un sucre en C-5 inactif ou, au plus, légèrement marqué sur le carbone C-5 , par suite de l'équilibre glucose $\left[1\text{-}^{14}C\right]$ ⟷ glucose $\left[1\text{-}6\text{-}^{14}C\right]$



La répartition d'activité sur les différents carbones des deux sucres est sensiblement parallèle, donc en accord avec la réduction directe du ribose en désoxyribose. La légère différence qui subsiste

s'explique aisément en supposant que le désoxyribose recueilli a été formé en moyenne, antérieurement au ribose qui, lui, est renouvelé plus rapidement dans les cellules, le rapport d'activité O_{-1}/C_{-5} étant très voisin de 2 pour le premier et inférieur à 2 pour le second. Le mécanisme de biosynthèse par réduction directe d'un nucléotide comme chez les bactéries est probable.

C - METHODES EXPERIMENTALES

a) Culture des cellules

Les cellules BHK (provenant du CENTRE de RECHERCHES sur le CANCER de VILLEJUIF) sont ensemencées dans des boîtes de Roux de 1 L. avec 80 ml de milieu d'Eagle modifié (Difco).

Après s'être développées à 37° pendant deux jours, les cellules sont changées de milieu. Au nouveau milieu de culture est inoculé de façon stérile 50 µc de glucose $[1-^{14}C]$. La culture se poursuit encore deux jours, puis les cellules sont recueillies. La culture active est diluée avec d'autres inactives, ce qui donne un poids de cellules humides total de 2 g environ.

b) Extraction des acides nucléiques

Les cellules sont broyées au Potter Elvehjem à 0° dans le TCA 10% pendant cinq minutes. Le broyat est centrifugé à 30.000 g pendant une heure entre 0° et 4°. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est déshydraté et dégraissé par une série de lavages à l'alcool et à l'éther, en centrifugeant à 30.000 g pendant une heure à 2° entre chaque. Le poids du résidu sec obtenu est de 351 mg.

Les acides nucléiques RNA et DNA sont extraits par traitement du résidu au NaCl 10% pendant vingt minutes à 100°. Après une centrifugation de quinze minutes, le surnageant est mis de côté et le culot de nouveau extrait. L'opération est répétée trois fois de suite. Au volume total d'extraction (7 cc) est ajouté un volume double d'alcool à 0° (14 cc). Les acides nucléiques précipitent au froid. Ils sont centrifugés à 30.000 g pendant trente minutes entre 0° et 4° et séchés sous vide sur P_2O_5 : 15 mg 20% de DNA pour 40% de RNA.

c) Isolement du ribose

La moitié du précipité d'acides nucléiques est hydrolysée par H_2SO_4 N/10 pendant six heures à 100° pour libérer le ribose. L'hydrolysat est ensuite déionisé par passage sur échangeur d'ions. Il est d'abord passé sur résine basique, Dowex 1 forme formiate pour fixer les acides sulfurique et phosphorique. Les eaux de lavage contenant le ribose sont concentrées à l'évaporateur rotatif jusqu'à 1 cc et passées sur résine acide Dowex $50H^+$ pour accrocher les bases nucléiques. Le ribose non

fixé est récupéré par lavage à l'eau. La solution est concentrée à l'évaporateur rotatif et évaporée à sec après avoir contrôlé que le pH de la solution est bien neutre.

On chromatographie sur papier Whatman n° III le résidu repris par 0,3 ml de méthanol, dans le système : Butanol - H_2O - acide acétique (4 ; 1 ; 5) (phase supérieure). Après repérage du ribose sur le chromatogramme à l'aide de témoins, la bande intéressante est découpée et éluée à l'eau. Au ribose purifié, élué (0,413 mg), est ajoutée une quantité totale de 30 mg de ribose entraîneur.

d) Isolement de l'acide lévulique

L'autre moitié du précipité d'acide nucléique, à laquelle on ajoute 16,7 mg d'acide lévulique entraîneur, est hydrolysée par 1,6 ml de H_2SO_4M pendant huit heures à 100°. L'acide lévulique est ensuite extrait en continu à l'éther pendant quarante-huit heures (cf : Méthodes chimiques, partie expérimentale - § IV).

e) Isolement des carbones C-1 et C-5

Cf : Méthodes chimiques, partie expérimentale - § V et VI.

II - BIOSYNTHESE DES DESOXYRIBONUCLEOTIDES DANS L'HEPATOME DE ZAJDELA

A - INTRODUCTION

La ribonucléotide réductase qui a été étudiée et purifiée, surtout chez les bactéries, doit cependant exister et pouvoir être mise en évidence dans tous les tissus en croissance rapide. LARSSON enregistre cette activité enzymatique dans des extraits bruts de foies de rats en régénération après hépatectomie, mais non dans ceux de foies d'animaux normaux ; par contre, avec des extraits partiellement purifiés, les deux types de foie ont une activité : celle des premiers étant environ vingt fois plus élevée que celle des seconds (49). Cette hypothèse est renforcée si l'on examine le domaine des tumeurs. Deux équipes de chercheurs différents viennent d'observer la réduction des nucléotides en désoxynucléotides à partir d'extraits cellulaires de rates de souris leucémiques (50-51) ; cependant, cette activité enzymatique est difficile à mettre en évidence, d'une part parce qu'elle est faible - environ dix fois plus faible que celle observée pour Escherichia coli, d'autre part parce qu'elle est variable avec l'état de développement du virus : elle est maximum lorsque les souris sont tuées cinq jours après avoir été inoculées avec le virus et ne cesse de décroître par la suite pour atteindre le cinquième de l'activité totale au bout de quinze jours. ELFORD et coll. ont étudié également la variation de l'activité de la ribonucléotide réductase en fonction de la prolifération cellulaire dans une série d'hépatomes du rat (52).

Quand nous avons commencé ce travail, les seuls résultats publiés concernaient des extraits peu purifiés de l'hépatome de NOVIKOFF (27). Un système thiorédoxine analogue à celui de Escherichia coli a été isolé et purifié depuis (53), mais l'enzyme elle-même, la ribonucléotide réductase n'a pas été obtenue pure et cristalline comme dans le cas du coli. Le schéma de réduction est le même. Il n'y a pas non plus participation d'un dérivé de la vitamine B_{12} mais, par contre, Fe^{+++} s'avère être un cofacteur supplémentaire.

Nous avons travaillé sur l'hépatome de ZAJDELA, tumeur du rat à croissance ascitique (54), facilement transplantable par injection intrapéritonéale hebdomadaire. Elle est comparable, par sa croissance rapide et son caractère stable (950ème passage), à l'hépatome de NOVIKOFF,

variante ascitique. La tumeur d'origine est un hépatome provoqué par l'administration chronique de diméthylaminoazobenzène.

Nous avons mis en évidence dans cette tumeur l'activité de la ribonucléotide réductase ; nous avons concentré l'enzyme et étudié ses exigences et ses propriétés. Nous avons montré la conservation du rapport d'activité Base/Sucre lors de la réduction avec la cytidine-5'-monophosphate [U-^{14}C] et, enfin, nous avons examiné également la stéréochimie de la réduction, ceci en appliquant toujours les méthodes décrites ci-dessus (cf : Méthodes chimiques - § II - C - A).

B - RESULTATS EXPERIMENTAUX

TABLEAU RECAPITULATIF DES ESSAIS ENZYMATIQUES

Substrat 50 m µmole 1 µc	ATP µmole	$FeCl_3$ µmole	Extrait enzymatique µl	dCMP formé mµmole
CDP [2-^{14}C]	0,25	0,01	80 extrait brut	0,22
CDP [2-^{14}C]	0,25	0,003	80 extrait brut	0,22
CDP [2-^{14}C]	0,25	-	80 extrait brut	0,11
CDP [2-^{14}C]	0,25	0,01	50 Fraction P 30 Fraction S	0,16
CMP [U-^{14}C]	0,75	0,003	80	0,07 ⌘ (+) 0,25 ⌘ (1)
CMP [2'-^{3}H]	0,75	0,003	80 extrait brut	0,12 (1)
CMP [2'-^{3}H] repurifié	0,75	0,003	80	0,12 (1)
CMP [U-^{14}C]	0,75	0,003	80 extrait brut de 8 jours	0,25
CMP [U-^{14}C]	0,75	0,003	80 extrait brut de 2 mois	0,08

Les concentrations des autres cofacteurs n'ont pas variées ; ce sont celles données plus bas.

⌘ Enzyme provenant de deux extractions différentes

+ Essai ayant servi à montrer la conservation du rapport d'activité Base/Sucre lors de la réduction

(1) Essais réalisés en parallèle.

C - DISCUSSION ET CONCLUSION

1. Mise en évidence de l'activité de la ribonucléotide réductase : propriétés du système

Les résultats obtenus n'ont pas toujours été très reproductibles. La quantité maximum de substrat réduit dans les conditions standard précisées correspond à 0,5%, mais des variations notables ont été enregistrées pour des préparations d'enzyme différentes.

D'autre part, on constate que l'activité enzymatique est la même que le substrat soit le mono ou le diphosphate du moment que la concentration en ATP est suffisante pour permettre la phosphorylation du monophosphate (10^{-3}M).

On observe une réduction d'activité de moitié si on n'ajoute pas au milieu d'incubation des ions Fe^{+++}. La concentration optimale reste faible : $2,5.10^{-5}$M.

L'enzyme concervée congelée à - 25° est relativement stable. Huit jours après l'extraction, l'activité reste la même ; mais au bout de deux mois, on constate qu'elle tombe au tiers de ce qu'elle était à l'origine.

Enfin, l'enzyme est concentrée et purifiée par précipitation à pH 5.

	Volume	Quantité de protéines mg/ml	Activité enzymatique	Activité spécifique
Extrait brut	5,6	21	0,22	0,12
Fraction P	1,2	16	0,16	0,20
Fraction S	4,7	17		

L'activité enzymatique est le nombre de mμmoles de désoxycytidine phosphate formé dans les conditions standard.

L'activité spécifique est l'activité enzymatique par mg de protéines.

2. Conservation du Rapport d'Activité Base/Sucre

La comparaison de l'activité totale de la désoxycytidine [U-^{14}C] avec celle portée par la partie sucre, isolée sous forme d'acide lévulique après hydrolyse acide, a donné :

	activité totale en cpm		activité spécifique
	déterminée expérimentalement	calculée	
désoxycytidine 5'-phosphate	1.450		
désoxycytidine	1.120		1.240 cpm/µmole

Après addition de 0,13 mmole de lévulate entraîneur

semicarbazone de l'acide lévulique			
lère cristallisation	350	585	2.670 cpm/mmole
2ème cristallisation	360		2.760 cpm/mmole

On retrouve sur l'acide lévulique 62% de l'activité théorique attendue, résultat comparable à celui obtenu pour le système bactérien, les 100% n'étant pas atteints pour les raisons indiquées. Là encore, la réduction de cytidine phosphate en désoxycytidine phosphate a lieu sans rupture de la liaison glycosidique.

3) Stéréochimie de la réduction

L'essai au tritium a été réalisé en double en utilisant deux sources différentes de cytidine 5'-monophosphate [2'-^{3}H] dont l'une a été repurifiée par rapport à l'autre. Dans les deux cas, la même activité a été enregistrée. La quantité de désoxycytidine 5'-monophosphate formée, avec les substrats tritiés, est la moitié de ce qu'elle est avec le substrat [^{14}C] , dans les conditions standard habituelles, les essais enzymatiques étant rigoureusement identiques. Cela pourrait s'expliquer par un effet isotopique du second ordre, à supposer que l'hydrogène en 2'

participe au mécanisme de réduction. Cependant, cette hypothèse n'est qu'évoquée : pour avoir une certitude, il aurait fallu recommencer l'expérience en contrôlant soigneusement la quantité de radioactivité introduite, ce que nous ne pouvions pas faire ne disposant plus d'enzyme actif.

La désoxycytidine 5'-monophosphate [2'-^{3}H] obtenue des deux essais ci-dessus a été hydrolysée par la phosphatase alcaline en désoxycytidine [2'-^{3}H] (11.000 dpm au total). Celle-ci, entraînée par 40 mg (0,150 mmole) de chlorhydrate de désoxycytidine, a été dégradée selon la méthode décrite pour localiser le tritium.

	Caractéristiques du produit			Quantité totale de produit en µmoles	Activité par mg dpm/mg	Activité spécifique dpm/ µmole
	F	Rf dans irrigant(1)				
		x	y			
désoxycytidine Ib				150		69
trityl-O-5' anhydro-2,3' désoxy-2'uridine Vb	120° -135°	0	0,31	30	148	67
trityl-O-5' dideoxy-2',3' uridinène-2' VIb	193° -196°	0,53	0,87	15	133	60

(1) Système irrigant x : chloroforme ; acétate d'éthyle : 1 ; 1
y : éthanol ; benzène : 1 ; 1

Là encore, nous constatons que les activités spécifiques portées par les produits précurseurs Ib, Vb et le produit insaturé VIb restent constantes. La stéréochimie de la réduction est donc la même pour ce système tumoral que pour le système bactérien : rétention de la configuration du carbone C-2'.

B - METHODES EXPERIMENTALES

a) Préparation des extraits

Le liquide ascitique soutiré du péritoine du rat atteint est centrifugé à 1000 t/mn pendant 5 minutes à 0°. Les cellules recueillies sont lavées plusieurs fois avec une solution Krebs-Ringer- phosphate 0,01M en glucose. Les cellules (3 ml) sont suspendues dans un volume et demi (4,5 ml) d'eau bidistillée à température ambiante, broyées au Potter Elvehjem pendant cinq minutes à 0° et centrifugées à 105.000 g pendant quarante-cinq minutes à 0°. Le surnageant est pipeté et congelé dans l'azote liquide. Juste avant l'emploi, l'extrait est dialysé pendant deux heures à 2° contre du TRIS 0,02M pH 6,5 10^{-3}M mercaptoéthanol, et le dialysat est ajustée à pH 7 avec NaOH 0,2M : c'est l'extrait brut.

Précipitation à pH 5

Toutes ces opérations sont réalisées entre 0° et 4°. Le surnageant à 105.000 g (5,6 ml) est acidifié à pH 5 avec CH_3COOH M, puis centrifugé à 20.000 g pendant 10 minutes. Le précipité est repris par 1,2 ml de TRIS 0,02M pH 5 10^{-3}M mercaptoéthanol et ajusté à pH 7. Il est dialysé juste avant l'emploi contre du TRIS 0,02M pH 7 10^{-3}M mercaptoéthanol pendant deux heures. Le dialysat est centrifugé à 20.000 g pendant 10 minutes et le précipité est écarté : le surnageant constitue la fraction P brute.

Le surnageant à pH 5 (4,3 ml) est ajusté à pH 4,5 avec CH_3COOH 0,1M, centrifugé à 20.000 g pendant 10 minutes, le précipité écarté et le nouveau surnageant neutralisé à pH 7,25 avec NaOH M : c'est la fraction S brute.

b) Essais enzymatiques

Le milieu d'incubation comprend dans un volume total de 0,12 ml: 0,050 µmole de substrat : CDP $[2-^{14}C]$ ou CMP $[U-^{14}C]$ ou CMP $[2'-^{3}H]$ d'activité spécifique 20 mc/mmole (1 µc), 0,25 ou 0,75 µmole d'ATP, 0,5 µmole de $MgCl_2$, 0,003 µmole de $FeCl_3$, 0,15 µmole de NADPH, 1 µmole de TRIS pH 7 80 µl d'extrait brut ou 50 µl de Fraction P + 30 µl de Fraction S.

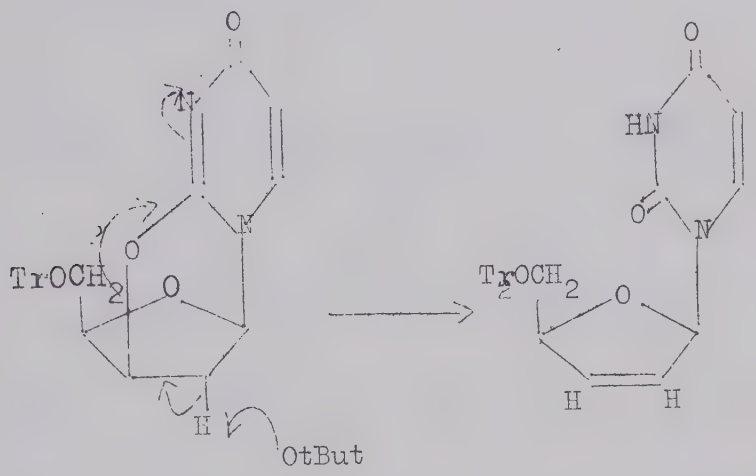
L'incubation dure trente minutes à 37°.

La mise en évidence de la réduction de cytidine phosphate, l'isolement de désoxycytidine se font selon le procédé de REICHARD (cf Chapitre précédent : V - c) d))

La quantité de protéine est déterminée par le dosage FOLIN-LOWRY (55).

C O N C L U S I O N

Toutes nos conclusions reposent sur le mécanisme de l'élimination Vb ——→ VIb que nous avons supposé être trans suivant le schéma ci-après :



Vb VIb

Ce mécanisme fort probable n'était pas tout à fait certain ; mais, parallèlement à notre travail, il a été synthétisé au laboratoire la désoxycytidine marquée de façon connue en 2' avec un atome de deutérium (56) : l'examen de son spectre R.M.N. et sa comparaison avec celui obtenu par REICHARD pour la désoxycytidine synthétisée enzymatiquement dans de l'eau lourde ont permis de confirmer également la rétention de configuration.

De ce fait, retournant le problème et prenant cette donnée pour acquise, nous avons confirmé, lors de notre expérience avec Escherichia coli, que le sens de l'élimination Vb ——→ VIb était trans ; nous avons alors appliqué cette réaction de trans élimination à l'élucidation de mécanismes de réduction qui n'avaient pu jusqu'à présent être abordés par aucune autre méthode.

B I B L I O G R A P H I E

1 - A.F. COOK et J.G. MOFFATT, J. Amer. Chem. Soc. 1967, 89, 2697

2 - A.C. CHANDHURI, Y. HARADA, K. SHIMIZU, M. GUT et R.I. DORFMAN, J. Biol. Chem. 1962, 237, 703

3 - J.H. HUNTER, Chem. Abs. 1964, 61, 4467 a

4 - J.L. DARLIX, H.P.M. FROMAGEOT, P. FROMAGEOT, Biochim. Biophys. Acta 1967, 145, 517

5 - P. REICHARD, Acta Chem. Scand. 1958, 12, 2048

6 - J.P. HORWITZ, J. CHUA, I.L. KLUNDT, M.A. DAROOGE, M. NOEL, J. Amer. Chem. Soc. 1964, 86, 1896

7 - K. SISIDO, S. KOSIMA, K. TAKIZAWA, Tetrahedron Letters 1967, 33

8 - T. ANDO, F. NAMIGATA, H. YAMANAKA, W. FUNASAKA, J. Amer. Chem. Soc. 1967, 89, 5719

9 - F.R. JENSEN, D.B. PATTERSON, Tetrahedron Letters 1966, 3837

10 - J.F. CODINGTON, I.L. DOERR, J.J. FOX, J. Org. Chem. 1964, 29, 558

11 - T. NAITO, M. HIRATA, Y. NAKAI, T. KOBAYASHI, M. KANAO, Chem. Pharm. Bull. 1968, 16(2), 285

12 - R.L. LETSINGER, K.K. OGILVIE, J. Org. Chem. 1967, 32, 296

13 - D. IWACHA, K.K. OGILVIE, Can. J. Chem. 1969, 47, 495

14 - J.F. CODINGTON, I.L. DOERR, J.J. FOX, J. Org. Chem. 1964, 29, 564

15 - J.F. CODINGTON, R. FECHER, J.J. FOX, J. Amer. Chem. Soc. 1960, 82, 2794

16 - A. HOLY, Tetrahedron Letters 1971, 189

17 - J. FARKAS, F. SORM, Coll. Czech. Chem. Comm. 1967, 32, 2663

18 - R.E. REEVES, J. Amer. Chem. Soc., 63, 1477

19 - S. DAVID, P. JAYMONT et J. MATRICON, Bull. Soc. Chim. 1960, 1728

20 - E. RACKER, J. Biol. Chem. 1952, 196, 347

21 - F.K. BAGATELL, E.M. WRIGHT et H.Z. SABLE, J. Biol. Chem. 1959, 234, 1369

22 - G. BRAY, Anal. Biochem. 1960, 1, 279

23 - I.A. ROSE et B.S. SCHNEIGERT, J. Biol. Chem. 1953, 202, 635

24 - N.C. BROWN, Z.N. CANELLAKIS, B. LUNDIN, P. REICHARD, L. THELANDER, European J. Biochem. 1969, 9, 561

25 - M. GOULIAN, W. BECK, J. Biol. Chem. 1966, 241, 4233

26 - P. REICHARD, J. Biol. Chem. 1961, 236, 2511

27 - E. COLLEEN MOORE et P. REICHARD, J. Biol. Chem. 1964, 239, 3453

28 - S. DAVID et C. ROUZEAU, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1971, 43, 46

29 - S. DAVID, B. ESTRAMAREIX, C. ROUZEAU, Biochim. Biophys. Acta 1967, 142, 270

30 - N.C. BROWN et P. REICHARD, J. of Mol. Biol. 1969, 46, 25

31 - T.C. LAURENT, E.C. MOORE et P. REICHARD, J. Biol. Chem. 1964, 239, 3436

32 - E.C. MOORE, P. REICHARD, L. THELANDER, J. Biol. Chem. 1964, 239, 3445

33 - L. THELANDER, European J. Biochem. 1967, 4, 407

34 - C. BISWAS, J. HARDY, W.S. BECK, J. Biol. Chem. 1965, 240, 3631

35 - A. LARSSON et P. REICHARD, J. Biol. Chem. 1966, 241, 2533

36 - A. LARSSON et P. REICHARD, J. Biol. Chem. 1966, 241, 2540

37 - N.C. BROWN et P. REICHARD, J. of Mol. Biol. 1969, 46, 39

38 - N.C. BROWN, R. ELIASSON, P. REICHARD et L. THELANDER, European J. of Biochem. 1969, 9, 512

39 - A. LARSSON, Biochem. 1965, 4, 1984

40 - L.J. DURHAM, A. LARSSON, P. REICHARD, European J. Biochem. 1967, 1, 92

41 - R.U. LEMIEUX, Can. J. Chem. 1961, 39, 116

42 - C.D. JARDETZKY, J. Amer. Chem. Soc. 1961, 83, 2919

43 - P. REICHARD, A. BALDESTEN, L. RUTBERG, J. Biol. Chem. 1961, 236, 1150

44 - P. REICHARD, J. Biol. Chem. 1962, 237, 3513

45 - W. SHREEVE, J. Biol. Chem. 1959, 234, 246

46 - D. GHOSH et I.A. BERNSTERN, Biochim. Biophys. Acta 1963, 72, 1

47 - B.L. HORECKER, G. DOMAGK et H.H. HIATT, Arch. Biochem. Biophys. 1958 78, 510

48 - Z. DISCHE, Mikrochemie 1930, 8, 4

49 - A. LARSSON, European J. of Biochem. 1969, 11, 113

50 - J.R. STEEPER et C.D. STENART, Anal. Biochem. 1970, 34, 123

51 - S. FUJIOKA et R. SILBER, J. Biol. Chem. 1970, 245, 1688

52 - H.L. ELFORD, M. FREESE, E. PASSAMANI, H.P. MORRIS, J. Biol. Chem. 1970, 245, 5228

53 - E. COLLEEN MOORE, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1967, 29, 264

54 - F. ZAJDELA, Colloque franco-soviétique "Quelques problèmes posés par la cellule cancéreuse" Gauthiers-Villars, Paris 1964

55 - O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL, J. Biol. Chem. 1951, 193, 265

56 - S. DAVID, J. EUSTACHE, Carbohydrate Research 1971, 16, 469

TABLE DES MATIERES

Pages

NUMEROTATION DES NUCLEOSIDES PYRIMIDIQUES..... 1

PRINCIPALES ABREVIATIONS..... 2

INTRODUCTION..... 3

1ère Partie : METHODES CHIMIQUES..... 5

DISCUSSION

I - Préparation de substrats radioactifs..... 5

Synthèse de cytidine-5' monophosphate [2'-^{3}H]

II - Dégradations chimiques

A - Localisation du tritium sur le désoxynucléoside [2'-^{3}H] 9

B - Etude de la réduction par l'hydrure de tri-n-butylétain..... 11

C - Hydrolyse de la désoxycytidine..... 18

D - Dégradation du ribose..... 19

E - Dégradation du désoxyribose..... 20

PARTIE EXPERIMENTALE

Détails expérimentaux généraux..... 21

I - Synthèse de cytidine-5' monophosphate [2'-^{3}H] 22

II - Dégradation de la désoxycytidine [2'-^{3}H] 25

III- Réduction par l'hydrure de tri-n-butylétain..... 28

IV - Hydrolyse de la désoxycytidine..... 32

V - Dégradation du ribose..... 33

VI - Dégradation du désoxyribose : dégradation de l'acide lévulique..... 34

2ème Partie : ETUDES DE BIOSYNTHESE

INTRODUCTION..... 36

Chapitre I : BIOSYNTHESE DES DESOXYRIBONUCLEOTIDES CHEZ ESCHERICHIA COLI

I - Données bibliographiques générales..... 38

II - Problème de la stéréochimie..... 41

III- Mise en évidence de la réduction..... 42

Pages

IV - Résultats et Discussion :

A - Mise en évidence de l'activité de la ribonucléotide réductase..... 43

B - Conservation du rapport d'activité Base/Sucre..... 44

C - Localisation du tritium ; stéréochimie de la réduction..... 45

V - Méthodes expérimentales..... 48

- Chapitre II : BIOSYNTHESE DU DESOXYRIBOSE ET DES DESOXYRIBONUCLEOTIDES DANS LES TUMEURS

I - Biosynthèse du désoxyribose dans les cellules BHK

A - Introduction au problème de la communauté d'origine du ribose et du désoxyribose..... 52

B - Résultats expérimentaux - Discussion - Conclusion... 54

C - Méthodes expérimentales..... 57

II - Biosynthèse des désoxyribonucléotides dans l'hépatome de ZAJDELA

A - Introduction..... 59

B - Résultats expérimentaux..... 61

C - Discussion et Conclusion :

1. Mise en évidence de l'activité de la ribonucléotide réductase - propriétés du système..... 62

2. Conservation du rapport d'activité Base/Sucre.... 63

3. Stéréochimie de la réduction..... 63

D - Méthodes expérimentales..... 65

CONCLUSION..... 66

BIBLIOGRAPHIE..... 67